

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Marcos Vinicius Miranda Mesquita

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO QUANTITATIVO POR ANÁLISE DE
IMAGENS PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS TERCIÁRIAS COM BASE
EM ENSAIOS DE FEIGL**

Rio de Janeiro

2017

Marcos Vinicius Miranda Mesquita

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO QUANTITATIVO POR ANÁLISE DE
IMAGENS PARA DETERMINAÇÃO DE AMINAS TERCIÁRIAS COM BASE EM
ENSAIOS DE FEIGL

Projeto Final de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Químico com Atribuições Tecnológicas.

Orientador: Professor Claudio Costa Neto

Co-orientador: MSc. Vinicius Kartnaller

Rio de Janeiro

2017

A Celyta, João, Luiza e Manoel,

meus queridos avós.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que é o detentor de todo poder e de toda sabedoria. A Ele sejam dadas a glória, a honra e a adoração, para sempre.

Agradeço à minha família, por sempre estar comigo, não me deixando faltar nada. Em especial aos meus pais, Marcos Leite Mesquita e Noemia Alves Miranda Mesquita, e a minha irmã, Caroline, e minha sobrinha, Antonia – a alegria de nossa casa.

Aos amigos atemporais, que me acompanham há anos, e aos que encontrei ao longo da graduação: muito obrigado por mostrarem tamanha prova de amor ao me aturarem por todo esse tempo, ou por saberem fingir tão bem.

Quero mostrar gratidão à orientadora da minha iniciação científica/tecnológica, Alessandra Viçosa (Farmanguinhos – Fiocruz), pela oportunidade de trabalho e crescimento científicos, por todos os ensinamentos e pelo cuidado comigo.

Agradeço a Antonio Fidalgo, João Ricardo Teixeira e todos os técnicos e analistas dos Institutos SENAI de Tecnologia Ambiental e Inovação Química Verde (Sistema FIRJAN) por terem proporcionado a mim um grande ambiente de trabalho, onde pude adquirir orientação e qualificação profissionais, e principalmente por construir experiência e maturidade para o mercado de trabalho.

Aos professores João Massena e Marta Medeiros, através do Pré-Vestibular Samora Machel, por confirmarem em mim o desejo pela docência, e pela experiência marcante que vivi: *kanimambo!*

Cabe um agradecimento mais que especial ao professor João Cajaiba e a todos do Núcleo de Desenvolvimento de Processos e Análises Químicas em Tempo Real (NQTR), que me introduziram no campo científico, despertando em mim o amor pelo conhecimento, pela ciência química. Obrigado também por criarem em mim a crítica, o questionamento, sobre toda e qualquer informação. Não poderia estar em melhor grupo.

“Não há limites para as ideias. A limitação das coisas está na limitação de quem as faz”. Estas palavras são repetidamente ditas pelo professor Claudio Costa Neto, e elas

têm guiado os meus passos até então. Ao professor CCN, obrigado por ser quem é, por me inspirar tanto como químico, quanto ser humano. Obrigado também pela oportunidade inenarrável que tenho ao conversar e aprender sobre química, e principalmente, sobre a vida, com o senhor. Levarei esta experiência para a vida.

Gratidão à Karina Peres, por juntos construirmos o amor, a paciência e o cuidado por todo esse tempo.

RESUMO

Os ensaios de Feigl, mais conhecidos como *spot tests*, se apresentam como uma ótima ferramenta química na análise funcional de moléculas orgânicas. Um dos ensaios citados por Feigl para a identificação de amins terciárias consiste na reação entre essa classe de substâncias com solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético (reagente de Palumbo), que gera um produto de coloração vermelha/violeta. Há vários métodos quantitativos para a determinação de amins terciárias, com uso de técnicas como espectrometria na região do ultravioleta-visível, fluorescência, potenciometria etc. Este trabalho de conclusão de curso objetiva o desenvolvimento de um método quantitativo para a determinação de amins terciárias (triethylamina, piridina e N,N-dimetilanilina), a partir da reação citada por Feigl, com o uso da técnica de análise de imagens em tempo real, que se fundamenta na medida das componentes vermelho, verde e azul (RGB) de uma imagem, cujo sensor é uma *webcam*. Foi desenvolvido um equipamento protótipo para a realização das análises. Foram avaliados diversos parâmetros que constituem a validação de um método analítico, ou seja, para verificar se o método desenvolvido serve para o fim a que se destina, como sensibilidade, precisão, linearidade, exatidão, seletividade etc. O método desenvolvido, de forma geral, atendeu todos esses parâmetros de forma satisfatória. Além disso, foi comparada a exatidão entre análise de imagens e espectrometria UV-vis para a determinação de amostras contendo N,N-dimetilanilina. A primeira técnica, relativamente mais acessível e rápida, apresentou os melhores resultados em termos de exatidão. Foram caracterizados, por espectrometria UV-vis, os produtos obtidos a partir da reação das amins terciárias com o reagente de Palumbo, além do reagente quando este está recém-preparado ou com mais de 100 dias de estoque. Espera-se que o método desenvolvido neste trabalho possa ser utilizado em disciplinas de análise orgânica e/ou afins, e que seja aprimorado para aplicação em estudos de poluição ambiental, na determinação de alguns alcaloides etc.

Palavras-chave: ensaios de Feigl; amins terciárias; análise de imagens; validação.

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.....33

Equação 2.....34

Equação 3.....35

Equação 4.....35

Equação 5.....35

Equação 6.....36

Equação 7.....56

Equação 8.....64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas para (a) ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotrioico), (b) anidrido cis-aconítico [ácido 2-(2,5-dioxofuran-3-il)acético] e (c) anidrido acético.....	22
Figura 2 – Possível produto formado da reação entre aminas terciárias e anidrido cis-aconítico (NEELY, 1993; SASS et al., 1958).....	23
Figura 3 – Cubo representativo para o sistema de cores RGB.....	26
Figura 4 – Composição da cor de uma imagem a partir do sistema RGB.....	27
Figura 5 – Mistura de cores subtrativa (CMYK) e aditiva (RGB), respectivamente.....	28
Figura 6 – Representação gráfica do modelo HSV (<i>Hue, Saturation, Value</i>).....	29
Figura 7 – Interface do <i>software</i> RGBView, desenvolvido por NQTR-IQ/UFRJ.....	30
Figura 8 – Estruturas químicas das aminas terciárias utilizadas: trietilamina (a), piridina (b) e N,N-dimetilanilina (c).....	38
Figura 9 – Esquema ilustrativo do equipamento protótipo utilizado para análise de imagens.....	40

Figura 10 – Estrutura química da butilamina.....	50
Figura 11 – Estrutura química da morfolina (tetraidro-1,4-oxazina).....	52
Figura 12 – Resposta da variação das componentes R, G, B e sua respectiva média aritmética, ao longo do tempo, para as diferentes soluções de trietilamina e o branco de análise.....	54
Figura 13 – Esquema do perfil de cor observado e a sua correlação com as imagens analisadas.....	55
Figura 14 – Proposta utilizada para considerar respostas de RGB que aumentem com a concentração do analito (exemplo: componente B).....	56
Figura 15 – Gráficos de ΔR contra concentração de trietilamina (M), das três triplicatas falsas.....	57
Figura 16 – Gráficos de ΔG contra concentração de trietilamina (M), das três triplicatas falsas.....	57
Figura 17 – Gráficos de ΔB contra concentração de trietilamina (M), das três triplicatas falsas.....	58

Figura 18 – Gráficos de Δ Média contra concentração de trietilamina (M), das três triplicatas falsas.....58

Figura 19 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas falsas, em função da concentração de trietilamina (M).....59

Figura 20 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas verdadeiras, em função da concentração de trietilamina (M).....60

Figura 21 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas falsas, em função da concentração de trietilamina (M), para a elaboração de suas respectivas curvas analíticas.....61

Figura 22 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas falsas, em função da concentração de piridina (M).....65

Figura 23 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas verdadeiras, em função da concentração de piridina (M).....66

Figura 24 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas falsas, em função da concentração de piridina (M), para a elaboração de suas respectivas curvas analíticas.....67

Figura 25 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas falsas, em função da concentração de N,N-dimetilanilina (M).....70

Figura 26 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas verdadeiras, em função da concentração de N,N-dimetilanilina (M).....71

Figura 27 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas falsas, em função da concentração de N,N-dimetilanilina (M), para a elaboração de suas respectivas curvas analíticas.....72

Figura 28 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas falsas, em função da concentração de N,N-dimetilanilina (M), em presença de butilamina, para a elaboração de suas respectivas curvas analíticas.....75

Figura 29 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas falsas, em função da concentração de N,N-dimetilanilina (M), em presença de butilamina, para a elaboração de suas respectivas curvas analíticas.....76

Figura 30 – Espectro de absorção (ultravioleta-visível) do produto formado pela reação entre N,N-dimetilanilina e o reagente de Palumbo.....79

Figura 31 – Curva analítica (absorvância em 390 nm contra a concentração de N,N-dimetilanilina), equação da reta obtida pela regressão linear e o coeficiente de correlação (r).....80

Figura 32 – Espectros de absorção (UV-vis) dos produtos formados entre as aminas terciárias e o reagente de Palumbo, do reagente de Palumbo e deste após 110 dias de preparo.....81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio.....32

Quadro 2 – Quantidades, em volume (V), de trietilamina, de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético (reagente) e de clorofórmio, além da concentração de trietilamina em cada uma das soluções preparadas.....42

Quadro 3 – Curva analítica com oito pontos e amostras a serem analisadas: quantidades, em volume (V), de solução de trietilamina, de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético (reagente) e de clorofórmio, além da concentração de trietilamina em cada uma das soluções preparadas.....43

Quadro 4 – Quantidades, em volume (V), de piridina, de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético (reagente) e de clorofórmio, além da concentração de piridina em cada uma das soluções preparadas.....44

Quadro 5 – Curva analítica com 8 pontos e amostras a serem analisadas: quantidades, em volume (V), de solução de piridina 0,124 M em clorofórmio, de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético (reagente) e de clorofórmio, além da concentração final de piridina em cada uma das soluções preparadas.....46

Quadro 6 – Quantidades, em volume, de N,N-dimetilanilina, de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético (reagente) e de clorofórmio, além da concentração de N,N-dimetilanilina em cada uma das soluções preparadas.....47

Quadro 7 – Curva analítica com 8 pontos e amostras a serem analisadas: quantidades, em volume (V), de solução de N,N-dimetilanilina, de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético (reagente) e de clorofórmio, além da concentração de N,N-dimetilanilina em cada uma das soluções preparadas.....49

Quadro 8 – Curva analítica com 8 pontos e amostras a serem analisadas: quantidades, em volume (V), de butilamina, de solução de N,N-dimetilanilina, de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético (reagente) e de clorofórmio, além da concentração de N,N-dimetilanilina em cada uma das soluções preparadas.....51

Quadro 9 – Equações das retas e coeficientes de correlação obtidos a partir da regressão linear dos dados, pelo método dos mínimos quadrados, de cada componente de cor em função da concentração de trietilamina.....61

Quadro 10 – Limites estimados de detecção e quantificação de trietilamina por análise de imagens, em termos de concentração (mM), para cada componente de cor.....62

Quadro 11 – Equações das retas e coeficientes de correlação obtidos a partir da regressão linear dos dados, pelo método dos mínimos quadrados, de cada componente de cor em função da concentração de piridina.....67

Quadro 12 – Limites estimados de detecção e quantificação de piridina por análise de imagens, em termos de RGB e Média, para cada componente de cor.....68

Quadro 13 – Equações das retas e coeficientes de correlação obtidos a partir da regressão linear dos dados, pelo método dos mínimos quadrados, de cada componente de cor em função da concentração de N,N-dimetilanilina.....72

Quadro 14 – Limites estimados de detecção e quantificação de N,N-dimetilanilina por análise de imagens, em termos de concentração (mM), para cada componente de cor.....73

Quadro 15 – Equações das retas e coeficientes de correlação obtidos a partir da regressão linear dos dados, pelo método dos mínimos quadrados, da componente Média em função da concentração de N,N-dimetilanilina, em presença (ou não) de outras aminas.....77

Quadro 16 – Limites de detecção e quantificação, obtidos a partir da curva analítica para a componente Média, de N,N-dimetilanilina, em presença (ou não) de outras aminas.....77

LISTA DE SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CCD – *Charge Couple Device*

CMOS – *Complementary Metal Oxide Semiconductor*

CMYK – *Cyan, Magenta, Yellow and Black (key)*

DNPM – Departamento Nacional de Produção Mineral

HSV – *Hue, Saturation and Value*

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia

IQ – Instituto de Química

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LD – Limite de Detecção

LED – *Light Emitting Diode*

LPM – Laboratório de Produção Mineral

LQ – Limite de Quantificação

NQTR – Núcleo de Desenvolvimento de Processos e Análises Químicas em Tempo Real

P.A. – Para Análise

P.S. – Para Síntese

RGB – *Red, Green and Blue*

RMSD – Root-Mean-Square Deviation

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros de validação citados pelo INMETRO (2010).....31

Tabela 2 – Configuração de câmera e vídeo da *webcam*, utilizada em todos os experimentos de análise de imagens.....41

Tabela 3 – Recuperação analítica de amostras de trietilamina, a partir da curva analítica para cada componente de cor, onde $C_{\text{calculada}}$ = concentração calculada de trietilamina (mM); $C_{\text{verdadeira}}$ = concentração verdadeira de trietilamina (mM); Rec. = recuperação (%).63

Tabela 4 – Valores para o desvio quadrático médio (RMSD) sobre a predição da concentração de trietilamina para todas as componentes de cor e sua média.....64

Tabela 5 – Recuperação analítica de amostras de piridina, a partir da curva analítica para cada componente de cor, onde $C_{\text{calculada}}$ = concentração calculada de piridina (mM); $C_{\text{verdadeira}}$ = concentração verdadeira de piridina (mM); Rec. = recuperação (%).69

Tabela 6 – Valores para o desvio quadrático médio (RMSD) sobre a predição da concentração de piridina, para todas as componentes de cor e sua média.70

Tabela 7 – Recuperação analítica de amostras de N,N-dimetilanilina, a partir da curva analítica para cada componente de cor, onde $C_{\text{calculada}}$ = concentração calculada de N,N-dimetilanilina (mM); $C_{\text{verdadeira}}$ = concentração verdadeira de N,N-dimetilanilina (mM); Rec. = recuperação (%).74

Tabela 8 – Valores para o desvio quadrático médio (RMSD) sobre a predição da concentração de N,N-dimetilanilina, para todas as componentes de cor e sua média.....74

Tabela 9 – Recuperação analítica de amostras de N,N-dimetilanilina, na presença (ou não) de outras aminas, a partir da curva analítica da componente Média, e valores de RMSD para a predição.....78

Tabela 10 – Recuperação analítica de amostras de N,N-dimetilanilina a partir de duas técnicas analíticas diferentes.....80

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1.	Análise quantitativa de grupamentos funcionais orgânicos através dos ensaios de Feigl.....	21
1.1.1.	<i>Spot test</i> para identificação de aminas terciárias.....	22
1.1.2.	Métodos quantitativos para determinação de aminas terciárias.....	24
1.2.	Análise de imagens.....	25
1.2.1.	Sistemas de cores.....	25
1.2.1.1.	O sistema RGB.....	26
1.2.1.2.	O sistema CMYK.....	27
1.2.1.3.	O sistema HSV.....	28
1.2.2.	Sensores de câmeras digitais.....	29
1.2.3.	O <i>software</i> RGBView.....	30
1.3.	Validação de um método analítico.....	30
1.3.1.	Seletividade.....	32
1.3.2.	Linearidade, faixa de trabalho e sensibilidade.....	33
1.3.3.	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	34
1.3.4.	Exatidão (tendência).....	36
1.3.5.	Precisão.....	36
1.3.6.	Robustez.....	37
2	OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1.	Método quantitativo por análise de imagens para trietilamina.....	41
3.1.1.	Estimativa da repetitividade e da reprodutibilidade do método.....	41
3.1.2.	Estimativa da linearidade, dos limites de detecção e quantificação e da exatidão do método.....	42
3.2.	Método quantitativo por análise de imagens para piridina.....	44
3.2.1.	Estimativa da repetitividade e da reprodutibilidade do método.....	44

3.2.2. Estimativa dos limites de detecção e quantificação, da exatidão e da linearidade/sensibilidade do método.....	45
3.3. Método quantitativo por análise de imagens para N,N-dimetilanilina.....	46
3.3.1. Estimativa da repetitividade e da reprodutibilidade do método.....	47
3.3.2. Estimativa da linearidade, dos limites de detecção e quantificação e da exatidão do método.....	48
3.3.3. Verificação da seletividade do método frente a outras classes de aminas.....	49
3.3.3.1. Estimativa da linearidade, dos limites de detecção e quantificação e da exatidão do método em presença de amina primária (butilamina).....	49
3.3.3.2. Estimativa da linearidade, dos limites de detecção e quantificação e da exatidão do método em presença de amina secundária (morfolina).....	51
3.3.4. Comparação da exatidão entre análise de imagens e espectrometria na região do ultravioleta-visível.....	52
3.4. Caracterização dos produtos e do reagente de Palumbo por espectrometria na região do ultravioleta-visível.....	52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1. Método quantitativo por análise de imagens para trietilamina.....	54
4.1.1. Estimativa da repetitividade e reprodutibilidade do método.....	54
4.1.2. Estimativa da linearidade, dos limites de detecção e quantificação e da exatidão do método.....	60
4.2. Método quantitativo por análise de imagens para piridina.....	64
4.2.1. Estimativa da repetitividade e reprodutibilidade do método.....	64
4.2.2. Estimativa da linearidade, dos limites de detecção e quantificação e da exatidão do método.....	66
4.3. Método quantitativo por análise de imagens para N,N-dimetilanilina.....	70
4.3.1. Estimativa da repetitividade e reprodutibilidade do método.....	70
4.3.2. Estimativa da linearidade, dos limites de detecção e quantificação e da exatidão do método.....	71

4.3.3. Verificação da seletividade do método frente a outras classes de aminas.....	75
4.3.4. Comparação da exatidão entre análise de imagens e espectrometria na região do ultravioleta-visível.....	79
4.4. Caracterização dos produtos e do reagente de Palumbo por espectrometria na região do ultravioleta-visível.....	81
 5 CONCLUSÕES.....	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 Análise quantitativa de grupamentos funcionais orgânicos através dos ensaios de Feigl

Os ensaios de Feigl, mais conhecidos na literatura química como *spot tests*, são um grupo de ferramentas importantes na análise funcional de moléculas orgânicas. O método criado pelo químico austríaco Fritz Feigl (1891-1971) permite, através dos conceitos de *especificidade*, *seletividade* e *sensibilidade* das reações usadas na caracterização dos grupos funcionais, que toda uma visão da Química possa ser construída com base nestes pilares. Grande parte dos ensaios é de natureza cromogênica, ou seja, implicam em uma mudança de cor entre reagente e produto (COSTA NETO, 2004).

O nome – *spot test* – remete à possibilidade da detecção de quantidades tão pequenas de analito quanto um nanograma deste em uma gota de solução, o que pode equivaler a diluições entre 1:5.000 a 1:500.000.000. Feigl introduziu os conceitos de “limite de identificação”, “limite de diluição” (ou o seu complemento, o “limite de concentração”), representados por valores numéricos, com o objetivo de tratar os níveis de concentração limite dos analitos detectáveis pelo método (ESPINOLA et al., 1995).

Toda química envolvida nas reações de Feigl é de grande valia para o ensino de Química Orgânica (COSTA NETO, 2004). Ademais, sob a perspectiva didática, é extremamente importante para a familiarização do estudante com um número grande de reações, permitindo assim a percepção sobre a importância dos grupamentos funcionais, e no que se refere à perturbação da reatividade destes grupamentos funcionais frente ao resto da molécula.

Vários *spot tests* que envolvem ensaios de pirólise, fluorescência, precipitação, reações catalisadas por enzimas, troca-iônica, em estado sólido foram desenvolvidos por Feigl para a detecção de compostos puros e também de impurezas em quantidades traço em compostos purificados (RATHORE, 1996).

É importante destacar que a grande maioria dos ensaios de Feigl, para a caracterização de grupamentos funcionais de moléculas orgânicas, foi desenvolvida no Brasil, a partir de

1940, quando Feigl e sua família, por efeitos da 2ª Guerra Mundial, atracaram em solo brasileiro. Foi no Laboratório de Produção Mineral, do então Departamento Nacional de Produção Mineral (LPM – DNPM), pertencente ao antigo Ministério da Agricultura, que Fritz Feigl foi contratado como tecnologista químico, com a missão de tornar realidade a pesquisa em microquímica no Brasil (ESPINOLA, 2009).

1.1.1 *Spot test* para identificação de aminas terciárias

Um *spot test* relativamente simples e seletivo para a detecção de aminas terciárias foi citado por Feigl: quando aminas terciárias básicas são aquecidas com solução de ácido cítrico (ou anidrido cis-aconítico) em anidrido acético, gera-se um produto de coloração vermelha-violeta (FEIGL, 1966). As estruturas químicas para o ácido cítrico, anidrido cis-aconítico e anidrido acético estão apresentadas na Figura 1.

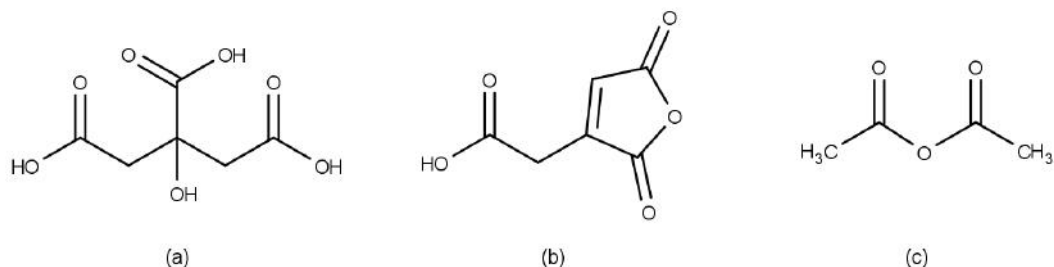


Figura 1 – Estruturas químicas para (a) ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotrioico), (b) anidrido cis-aconítico [ácido 2-(2,5-dioxofuran-3-il)acético] e (c) anidrido acético.

Sais de aminas terciárias, assim como sais de amônio quaternário – com exceção de sulfatos e fosfatos – também reagem da mesma maneira. Sais de potássio, rubídio, célio, estrôncio e bário apresentam resultados similares aos dos sais de amônio quaternário. Sais de metais alcalinos e alcalinos terrosos com ácidos orgânicos comportam-se da mesma forma (FEIGL, 1966).

Sabe-se que aminas secundárias e primárias não apresentam esta reação, pois são acetiladas pela ação do anidrido acético e transformadas em amidas (NAKAYAMA, 1980).

O procedimento descrito por Feigl consiste na mistura de uma gota da amina (ou uma gota de sua solução alcoólica) e uma gota de solução contendo 2 g de ácido cítrico dissolvidos em 100 mL de anidrido acético. Esta última solução é popularmente conhecida como “reagente de Palumbo” (COSTA NETO, 2004; PALUMBO, 1948). A mistura é aquecida em banho-maria a 80 °C, até o aparecimento de uma cor entre o vermelho e o roxo, o que indica uma resposta positiva. É obrigatória a realização de um branco (FEIGL, 1966).

As aminas terciárias, ou seus respectivos sais, citados na literatura, que apresentam um ensaio positivo são: piridina, trimetilamina, trietanolamina, metilefedrina, tribenzilamina, quinina, brucina, codeína, N,N-dimetilanilina, α -picolina, ácido nicotínico, trietilamina, quinolina, pilocarpina, estricnina, barberina, cinchonina, atropina, histidina, entre outras mais substâncias (FEIGL, 1966; KENNETH, 1987; SASS et al., 1958).

A estrutura química dos produtos desta reação não está ainda bem esclarecida. Além disso, não há uma uniformidade de opiniões sobre os passos da reação: alguns autores acreditam que há formação de um sal entre a amina e o anidrido cis-aconítico (Figura 2) (NEELY, 1993; SASS et al., 1958), enquanto outros apontam a amina terciária apenas como um catalisador na conversão do ácido cítrico em anidrido cis-aconítico, pela ação do anidrido acético, e que este produto, em contato com a amina, produz coloração (AUTERHOFF; SCHWINGEL, 1975; THOMAS, 1975).



Figura 2 – Possível produto formado da reação entre aminas terciárias e anidrido cis-aconítico (NEELY, 1993; SASS et al., 1958).

O reagente de Palumbo, sem amina terciária, adquire coloração ao longo do tempo de armazenamento, mas ainda não são conhecidos os motivos. Este fato produz mínimos efeitos sobre o ensaio, quando este é acompanhado de um branco (NEELY, 1993). Soluções de outros ácidos policarboxílicos em anidrido acético, além do cítrico, como dos ácidos malônico, tartárico, aconítico e itacônico também dão respostas positivas (KENNETH, 1987).

Alguns ensaios envolvem o uso de solventes que visam estabilizar a coloração obtida: água, etanol, 2-etoxietanol e butanol intensificam a cor e a fazem tender para o marrom, enquanto que solventes não hidroxilados, como tolueno ou dioxana, não alteram o caráter da cor, nem induzem o seu enfraquecimento. Com o uso destes solventes, a cor se desenvolve mais lentamente (LANGLEY, 1967). Clorofórmio também se mostra como bom solvente, mantendo a cor por até duas horas (NAKAYAMA, 1980; RATHORE; QURESHI; SULAIMAN, 1982)

1.1.2 Métodos quantitativos para determinação de aminas terciárias

O procedimento qualitativo de Palumbo já foi adaptado quantitativamente para a determinação de poluentes em água, alcaloides em medicamentos e ópio (RATHORE et al., 1982), traços de ácidos cítrico e tartárico em vinagre (RATHORE et al., 1984) e até mesmo de antibióticos em caldos de fermentação (NEELY, 1993), utilizando diversas técnicas de medida: espectrometria na região do ultravioleta-visível, cromatografia a líquido de alta eficiência, fluorescência (BATLEY et al., 1973) etc.

Nakayama (1980) fez uso da reação de Palumbo para a quantificação de aminas terciárias na fração básica do alcatrão de xistos oleígenos brasileiros. O método consistia na medida da absorvância dos produtos formados a partir da reação entre piridina, p-dimetilaminobenzaldeído, N,N-dimetilanilina e outras aminas terciárias, com o reagente de Palumbo, por espectrometria na região do ultravioleta-visível.

Um outro método, consolidado, descrito na literatura química para a quantificação de aminas terciárias em misturas de aminas é baseado na titulação potenciométrica de neutralização: inicialmente, a mistura de aminas é tratada com anidrido acético, pelo qual as aminas primárias e secundárias serão convertidas em suas respectivas amidas. A amina

terciária, então, é titulada com solução ácida (HCl ou HClO₄) em ácido acético. Um método mais satisfatório substitui o ácido acético por metanol ou 2-metóxi-etanol. Entretanto, independentemente do solvente, o procedimento é relativamente insensível e propenso a erros quando a concentração de amina terciária é inferior a 0,5%. Além disso, o procedimento não pode ser modificado pela redução da concentração do titulante (HCl ou HClO₄), ou pelo aumento da concentração da amostra, pois a curva de titulação será extremamente afetada pela ação tamponante das amidas formadas (SIGGIA, 1963).

Apesar da existência de diversos métodos instrumentais até então, estes podem apresentar um custo razoavelmente elevado, exigir longos tempos de análise, limitações de quantificação, entre outros fatores.

1.2 Análise de imagens

A análise de imagens tem sido utilizada em diferentes aplicações na química analítica, como para verificação da virada de cor de um indicador em titulações, determinação de íons metálicos, análises clínicas, estudos de cristalização etc (SILVA et al., 2013). Um sensor de baixo-custo usado na análise de imagens é a câmera filmadora geralmente denominada *webcam*. Quando há incidência de luz sobre um objeto, parte da intensidade luminosa é refletida. As câmeras digitais medem justamente a intensidade que é refletida, convertendo esta resposta em valores digitais armazenáveis (*bits*).

1.2.1 Sistemas de cores

O uso da cor em processamento de imagens é importante por dois principais motivos: a cor é um descritor muito poderoso na identificação de objetos (reconhecimento de padrões e extração de características); e enquanto o olho humano consegue distinguir pouco mais de 30 níveis de cinza, consegue distinguir mais de 1000 cores diferentes (GONZAGA; RODRIGUES; VIEIRA, 2017).

Os modelos (sistemas) de cores são importantes para facilitar a especificação de determinada cor a partir de algum padrão comum. Os principais sistemas são: **RGB** (*red, green and blue*), **CMYK** (*cyan, magenta, yellow and black*) e **HSV** (*hue, saturation and value*).

1.2.1.1 O sistema RGB

Em um sistema RGB, cada cor é definida pela quantidade de vermelho, verde e azul (*red, green e blue*) que a compõem. Trata-se de um modelo aditivo: as cores são criadas por adição e mistura das cores primárias de luz (vermelho, verde e azul) (PATTERSON, 2017). Este sistema funciona muito à semelhança do olho humano, e é utilizado em câmeras digitais, monitores, *scanners* etc (GONZAGA; RODRIGUES; VIEIRA, 2017).

A maioria dos arquivos digitais atuais usa números inteiros entre 0 e 255 para especificar estas quantidades, nas quais o número 0 indica ausência de intensidade luminosa (cor preta) e o número 255 indica intensidade luminosa máxima (cor branca) (UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE, 2014). Para melhor compreensão, pode-se associar cada cor do sistema RGB com pontos com coordenadas inteiras de um cubo com aresta de tamanho 255 (Figura 3). Nos vértices do cubo estão as cores primárias (vermelho, verde e azul), e as cores secundárias (ciano, magenta e amarelo).

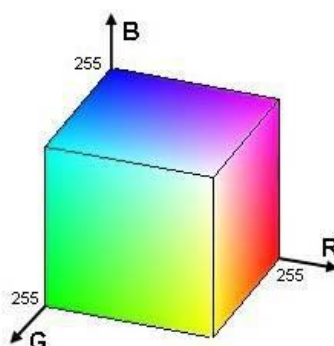


Figura 3 – Cubo representativo para o sistema de cores RGB.

A Figura 4 ilustra a composição de uma cor a partir do vermelho, verde e azul de uma imagem.

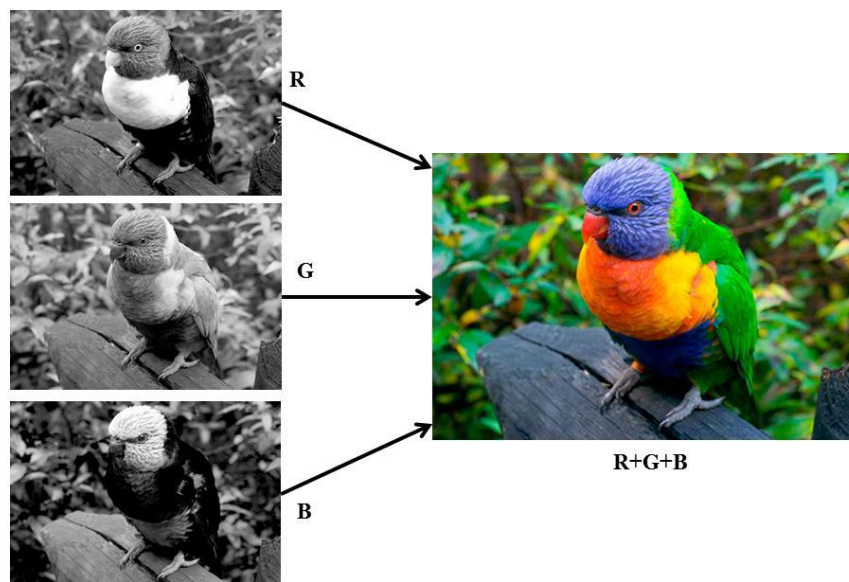


Figura 4 – Composição da cor de uma imagem a partir do sistema RGB.

1.2.1.2 O sistema CMYK

Este sistema emprega quatro canais para criar cor: ciano, magenta, amarelo e preto (*cyan, magenta, yellow e black*). As três primeiras cores existem na natureza, e o preto indica ausência de cor. Este último foi adicionado ao modelo em função das necessidades das indústrias de edição de documentos em papel, tornando o preto como cor chave (*key*) para definir detalhes em uma imagem. O modelo CMYK é amplamente utilizado em impressoras (GONZAGA; RODRIGUES; VIEIRA, 2017).

Ao contrário do sistema RGB, o CMYK é subtrativo: baseia-se na forma como a natureza cria as cores, refletindo parte do espectro eletromagnético, e absorvendo outras. Por exemplo: quando uma superfície com a cor ciano é iluminada com luz branca, nenhuma luz

vermelha é refletida, ou seja, o pigmento ciano subtrai a luz vermelha da luz branca refletida. A Figura 5 ilustra a mistura de cores subtrativa (CMYK) e aditiva (RGB).

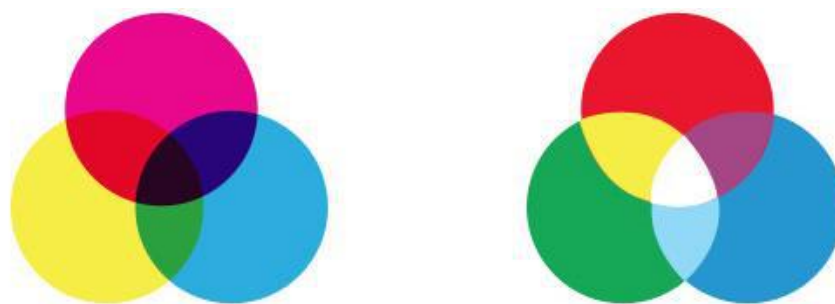


Figura 5 – Mistura de cores subtrativa (CMYK) e aditiva (RGB), respectivamente.

1.2.1.3 O sistema HSV

Baseia-se na percepção humana da cor – cromaticidade e intensidade. A **matiz** (H – *hue*) representa a cor pura. O seu valor varia entre 0° (vermelho), passando pelo laranja, amarelo, verde, azul, púrpura, e novamente vermelho. A **saturação** (S – *saturation*) indica a quantidade de luz branca que foi misturada com a cor pura. É inversamente proporcional: a cor pura tem saturação máxima, e quanto mais luz branca é adicionada à cor, menor a saturação. Já o **valor** (V – *value*) regula o brilho da cor (CÁMARA-CHÁVEZ, 2017). A cor preta possui brilho zero. O modelo HSV pode ser representado por um cone, como ilustra a Figura 6.

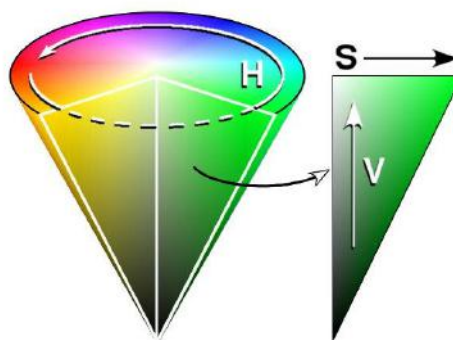


Figura 6 – Representação gráfica do modelo HSV (*Hue, Saturation, Value*).

1.2.2 Sensores de câmeras digitais

Atualmente, há dois tipos de sensores digitais de grande potência: o Dispositivo de Carga Acoplada, conhecido como **CCD** (*Charge Couple Device*) e o Semicondutor Complementar de Óxido Metálico, o **CMOS** (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*). Ambos consistem em circuitos integrados, constituídos por diversos componentes eletrônicos que geram pequenas cargas elétricas quando há incidência de luz sobre eles.

A grande diferença entre esses sensores está na forma pela qual recebem a intensidade luminosa. No CCD, quando há incidência de luz sobre a câmera, a radiação é direcionada para fotodiodos, que irão convertê-la em sinal elétrico, e assim, formar a imagem. O processo é bem simples: quanto mais luz incide sobre os fotodiodos, maior a carga elétrica obtida.

No sensor do tipo CCD, a luz branca passa por filtros baseados nos padrões RGB. A informação é analisada *pixel a pixel*, que é o menor componente de uma imagem digital. Por essa análise detalhada, o processo se torna relativamente mais lento, porém maior precisão é alcançada. Já nos sensores do tipo CMOS, a informação é analisada por conjunto de *pixels*, tornando o processo mais rápido (SISODIYA, 2013).

Os sensores CMOS, embora mais modernos, apresentam maior sensibilidade, o que faz com que eles sejam mais suscetíveis a ruídos – em função de interferência eletromagnética – do que os sensores do tipo CCD (SOUZA; CARDOZA, 2012).

1.2.3 O *software* RGBView

O Núcleo de Processos e Análises Químicas em Tempo Real do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (NQTR-IQ/UFRJ) desenvolveu o *software* *RGBView* (Figura 7) para analisar imagens em tempo real, avaliando as alterações das componentes RGB que um sensor de baixo-custo – a *webcam* – pode captar de uma região previamente delimitada da imagem. Há a possibilidade de se determinar o intervalo de tempo em que se deseja realizar tanto a amostragem, quanto à captura dos quadros (*frames*) para análise, além de se poder escolher a região da imagem que será analisada. Dessa maneira, o *software* traça um gráfico que mostra todo o comportamento dessas componentes e a média aritmética delas conforme o tempo de análise. A análise de imagens em tempo real tem sido amplamente utilizada para o monitoramento da cinética de reações que envolvam formação de precipitado e/ou mudança de cor, estudos de cristalização de fármacos etc (SILVA et al., 2012).

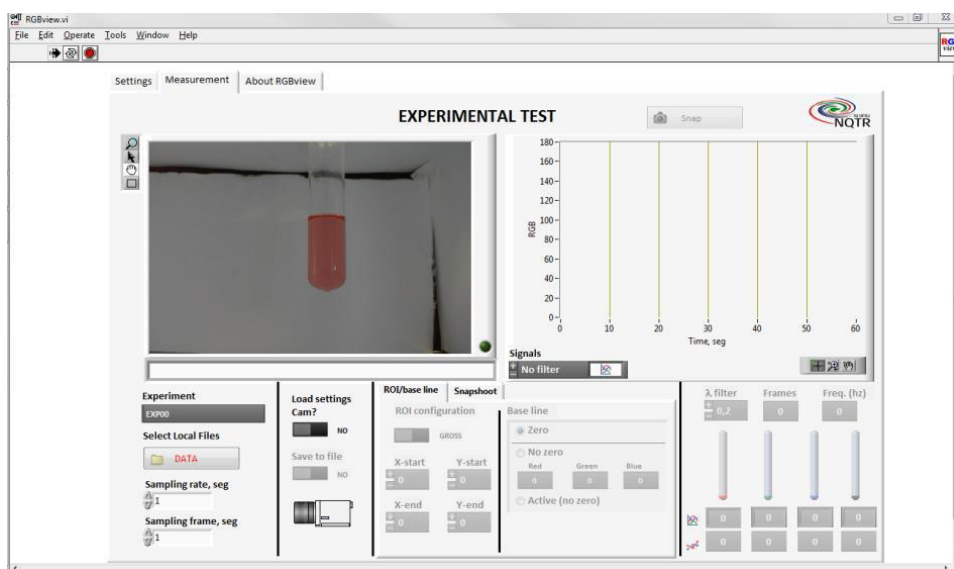


Figura 7 – Interface do *software* RGBView, desenvolvido por NQTR-IQ/UFRJ.

1.3 Validação de um método analítico

O bom funcionamento de qualquer método analítico depende intensamente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. Uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório é estabelecendo os limites destes parâmetros por meio da estimativa das “figuras de mérito”, numa etapa conhecida como **validação** (RIBEIRO et al., 2008). Em suma, a validação é o processo que demonstra que o método analítico é aceitável para a finalidade a que se destina (HARRIS, 2012).

As “figuras de mérito” são os indicadores quantitativos do escopo e do bom desempenho das técnicas, e são descritas na literatura como: seletividade, linearidade, sensibilidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez. Validar um método é um procedimento demorado, que requer um grande número de experimentos e cálculos estatísticos, gerando um aumento sobre o custo de análises (RIBEIRO et al., 2008).

O Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são os órgãos brasileiros que regulamentam a validação de métodos analíticos. A Tabela 1 apresenta os parâmetros de validação requeridos pelo INMETRO (2010).

Tabela 1- Parâmetros de validação citados pelo INMETRO (2010).

Parâmetro de validação - INMETRO
Seletividade
Linearidade
Faixa de trabalho e faixa linear
Limite de detecção
Limite de quantificação
Tendência/recuperação
Precisão
Robustez*

*É um parâmetro desejável, porém não obrigatório e entendido pelo INMETRO como a reprodutibilidade do método.

Os parâmetros que necessitam ser calculados durante o processo de validação podem variar de acordo com o tipo de ensaio (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, 2010), como mostra o Quadro 1.

Quadro 1 - Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Parâmetros	Tipo de ensaio		
	Qualitativo	Determinação do analito em maior teor (1)	Análise de elementos menores e traços (2)
Precisão		√	√
Seletividade	√	√	√
Tendência/recuperação		√	√
Robustez	√	√	√
Sensibilidade/linearidade/faixa de trabalho		√	√
Limite de detecção	√		√
Limite de quantificação			√

(1) Um analito é considerado em maior teor quando sua concentração é maior que 1%;

(2) São consideradas como de menor teor concentrações entre 0,01-1%, e elementos traços aqueles que estiverem em concentração abaixo de 0,01%.

1.3.1 Seletividade

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da determinação do analito. Estes interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude dos seus efeitos também pode depender da concentração destas espécies. A **seletividade** de um método é a habilidade que este tem em estimar inequivocamente a concentração do analito na presença de outros componentes. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão do método estarão seriamente comprometidas (RIBANI et al., 2004).

O mesmo significado tem sido frequentemente utilizado para o termo especificidade, o que tem gerado certa confusão. A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*) recomenda o termo seletividade. Um método instrumental que produz resposta para uma única substância de interesse pode ser chamado de específico, enquanto que aquele que produz resposta para vários compostos químicos, com uma ou mais características em comum, pode ser chamado de seletivo (VESSMAN et al., 2001).

1.3.2 Linearidade, faixa de trabalho e sensibilidade

A **linearidade** corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, a substância de exame, dentro de uma determinada faixa de trabalho. Na maioria das vezes, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa do analito deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para as concentrações ou massas conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, frequentemente, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica. Embora dois pontos definam uma reta, na prática se recomenda o mínimo de cinco pontos para a construção de uma curva analítica (RIBANI et al., 2004). A Equação 1 mostra a dependência entre a resposta medida (y) e a concentração do analito (x), obtida por regressão linear, a partir do método dos mínimos quadrados (HELENE, 2014).

$$y = a + bx \quad (\text{Equação 1})$$

Onde a e b são os coeficientes linear e angular da reta, respectivamente. Além do conhecimento desses coeficientes, pode-se também calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação (r). Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. O INMETRO (2010) recomenda um coeficiente de correlação com um valor acima de 0,90.

A relação descrita pela Equação 1 só é válida para um determinado intervalo de concentração do analito. O intervalo de concentrações do analito no qual é verificada a linearidade entre os pontos da curva analítica constitui a **faixa de trabalho**.

A **sensibilidade** é a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. De forma prática, a sensibilidade pode ser verificada através do coeficiente angular de uma curva analítica, pois quanto maior o coeficiente angular da reta, uma pequena diferença na concentração do analito irá gerar maior variação no valor do sinal analítico medido.

1.3.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O **limite de detecção (LD)** é um critério de desempenho extremamente importante de ser avaliado, tanto para ensaios qualitativos, como quantitativos. Esta importância se dá, pois é necessário saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método quando são medidas em amostras com baixos níveis do analito, como por exemplo, análise de traços (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, 2010). A quantidade, expressa no limite de detecção, não necessariamente deve ser passível de quantificação. O LD indica o nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco/ruído.

O LD pode ser calculado de várias maneiras. Um dos métodos para o seu cálculo envolve a avaliação do branco (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, 2010), através da Equação 2.

$$LD = \bar{x}_{branco} + t_{(n-1,1-\alpha)}s_{branco} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

\bar{x}_{branco} = média aritmética dos valores dos brancos da amostra;

$t_{(n-1,1-\alpha)}$ = distribuição de Student, dependente do tamanho de amostra (n) e o grau de confiança (α);

s_{branco} = desvio padrão dos valores dos brancos da amostra.

O INMETRO (2010) recomenda o número mínimo de sete replicatas para o cálculo do limite de detecção. De acordo com a Equação 2, o limite de detecção será expresso nas unidades da resposta, do sinal analítico. Para obtê-lo em termos de concentração do analito, basta utilizar a equação da reta obtida por regressão linear da curva analítica.

O **limite de quantificação (LQ)** corresponde à menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis (ICH, 2005). Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração.

Assim como o LD, o LQ também pode ser calculado por diversas formas. As Equações 3-5 mostram os cálculos possíveis para a estimativa do limite de quantificação, recomendados pelo INMETRO (2010),

$$LQ = \bar{x}_{branco} + 5s_{branco} \quad (\text{Equação 3})$$

$$LQ = \bar{x}_{branco} + 6s_{branco} \quad (\text{Equação 4})$$

$$LQ = \bar{x}_{branco} + 10s_{branco} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

\bar{x}_{branco} = média aritmética dos valores dos brancos da amostra;

s_{branco} = desvio padrão dos valores dos brancos da amostra.

O INMETRO (2010) recomenda o número mínimo de sete replicatas para o cálculo do limite de quantificação. A IUPAC propõe o valor “10” como valor padrão da equação (Equação 5) (VESSMAN et al., 2001). O uso das outras equações depende do rigor analítico exigido. Para análise em nível de traços, recomenda-se adotar o LQ como a concentração mais baixa da curva analítica.

1.3.4 Exatidão (tendência)

A exatidão de um procedimento analítico expressa o grau de proximidade entre o valor medido ($\text{Concentração}_{\text{calculada}}$) e um valor de referência considerado verdadeiro ($\text{Concentração}_{\text{verdadeira}}$) (RIBEIRO et al., 2008). A exatidão de um método pode ser avaliada numericamente através da **tendência**, também chamada de **recuperação**, que pode ser expressa pela Equação 6:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração}_{\text{calculada}}}{\text{Concentração}_{\text{verdadeira}}} \times 100\% \quad (\text{Equação 6})$$

O valor medido ($\text{Concentração}_{\text{calculada}}$) pode ser obtido a partir da equação da regressão linear dos pontos que constituem a curva analítica, tendo conhecida a resposta do sinal para a amostra em questão, obviamente.

1.3.5 Precisão

O parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra é a **precisão** do processo analítico. As três formas mais comuns de expressar a precisão de um método são por meio da **repetitividade**, da **precisão intermediária** e da **reprodutibilidade** do método (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, 2010).

As condições de repetitividade podem ser caracterizadas utilizando:

- Mesmo procedimento de medição;
- Mesmo observador;
- Mesmo instrumento usado sob mesmas condições;
- Mesmo local;
- Repetições no menor espaço de tempo possível.

A precisão intermediária, ou precisão intercorridas, define a precisão dentro de um mesmo laboratório para medidas obtidas por diferentes analistas, ou em diferentes dias, ou por equipamentos diferentes. Quanto à reprodutibilidade, esta define a precisão dos resultados obtidos para uma determinada análise realizada por laboratórios diferentes, mas seguindo a mesma metodologia (RIBEIRO et al., 2008). Para a verificação de todos os três parâmetros, o INMETRO (2010) recomenda o número mínimo de sete replicatas.

1.3.6 Robustez

A robustez de um método é a sua capacidade de resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos sem alterar significativamente sua exatidão e precisão, portanto, é uma medida da quantidade de variabilidade que o método pode suportar, sem perder a confiabilidade, e sua estimativa depende do tipo de metodologia analítica utilizada (RIBEIRO et al., 2008).

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Objetivos:

- Desenvolver um método quantitativo rápido e de baixo-custo para a determinação de três aminas terciárias – trietilamina, piridina e N,N-dimetilanilina (Figura 8), com base em um dos ensaios de Feigl, utilizando a técnica de análise de imagens em tempo real. Serão contempladas, assim, três classes de aminas terciárias: alifática, heterocíclica e aromática;
- Através do método desenvolvido, avaliar os parâmetros possíveis para o alcance da estimativa da validação do mesmo, tais como: seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação etc.

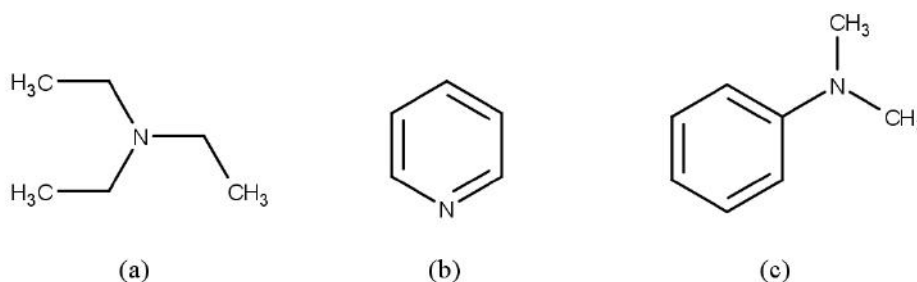


Figura 8 – Estruturas químicas das aminas terciárias utilizadas: trietilamina (a), piridina (b) e N,N-dimetilanilina (c).

As aminas terciárias apresentam uma classe de compostos que são consideravelmente presentes na química, seja em reações de laboratório seja nas indústrias química e farmacêutica (NEELY, 1993). Portanto, produzir um método para a determinação desta classe utilizando análise de imagens em tempo real tornará, de certa forma, mais barata e prática a determinação destas classes funcionais. O método descrito neste trabalho é comparado com uma técnica espectrométrica. Para mais, espera-se buscar mais informações sobre a natureza da reação entre aminas terciárias e o reagente de Palumbo, entretanto este não é o objetivo do presente trabalho.

Além disso, busca-se estimular a produção e utilização do instrumento de medida desenvolvido, a fim de ser utilizado em disciplinas de análise orgânica nos ensinos técnico e superior de química. Este trabalho, de certa forma, busca contribuir para o uso do presente método para aplicações em estudos de poluição ambiental, na determinação de alcaloides, de nitrogênio de aminas terciárias em medicamentos etc.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os ensaios que envolveram análise de imagens foram realizados com o auxílio de um equipamento protótipo, que consistia numa caixa metálica, com dimensões de 12 cm x 14 cm x 21 cm, forrada internamente com papel cartolina branco, com acessos para uma *webcam*, uma lâmpada LED (*light emitting diode*) para iluminação interna, e um tubo de ensaio. Este último, preso a uma garra simples, anexada a um suporte universal. O equipamento protótipo está ilustrado na Figura 9. A *webcam* utilizada era da marca Microsoft, modelo LifeCam Cinema 720p HD. Quanto à lâmpada LED, esta era articulada, com 20 cm de extensão, portando entrada USB para energização.

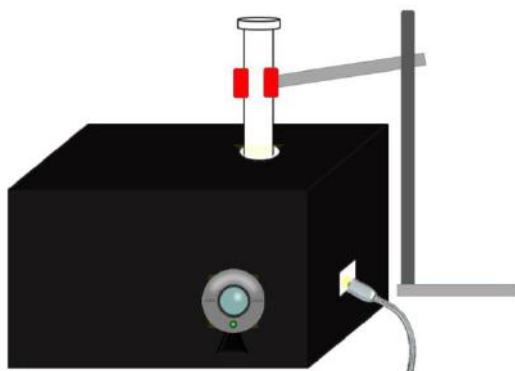


Figura 9 – Esquema ilustrativo do equipamento protótipo utilizado para análise de imagens.

Foi utilizada a mesma configuração de câmera e vídeo da *webcam* para todos os experimentos. A configuração empregada se encontra na Tabela 2, e traduz condições de imagem e de vídeo que não seriam perturbadas facilmente por variações de iluminação, reflexos na parede do tubo de ensaio etc. A região de imagem analisada compreendia na área situada entre os seguintes pontos: $x_o = 667$; $x_f = 737$; $y_o = 376$; $y_f = 479$, todos referentes ao mapa xy do quadro de pixel da imagem. Esta área foi selecionada por cobrir considerável região da imagem na qual se encontravam as soluções, e por não ser suscetível a desvios de imagem, perturbações por movimento, entre outros fatores. Todas as variáveis foram configuradas via o *software* RGBView.

Tabela 2 – Configuração de câmera e vídeo da *webcam*, utilizada em todos os experimentos de análise de imagens

Parâmetro	Valor
Brilho	94
Contraste	0,0299
Saturação	91
Exposição	-4
Balanco de branco	5472
Nitidez	13
Foco	19
Inclinação	0
Panorâmica	0
<i>Zoom</i>	4

A análise de todos os dados, referentes à análise de imagens, foi realizada via *software* Microsoft Excel 2010.

A maioria dos parâmetros de validação será estimada, visto que algumas exigências do INMETRO (2010) não serão atendidas. Por exemplo: não há como determinar a reprodutibilidade do método, para este trabalho, através da realização deste a partir de diferentes analistas, ou equipamentos, laboratórios etc. No entanto, tentou-se estimar este parâmetro dentro das limitações descritas ao longo desta seção.

3.1 Método quantitativo por análise de imagens para trietilamina

3.1.1 Estimativa da repetitividade e da reprodutibilidade do método

Em tubos de ensaio, foram preparadas cinco soluções com concentrações distintas de trietilamina P.S. (densidade = 0,7275 g/mL), a partir da adição de volumes entre 5 – 25 µL da amina, seguida da adição de 3,0 mL de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético, além

de um branco contendo somente 3,0 mL desta última solução. Em seguida, os seis tubos de ensaio foram levados ao banho-maria a 80 °C por 3 minutos. Ao fim, cada um dos tubos recebeu 7,0 mL de clorofórmio P.A.. Todos os volumes foram retirados com o auxílio de pipetas automáticas. O Quadro 2 apresenta os volumes utilizados dos reagentes citados, bem como a concentração de trietilamina presente em cada tubo, expressa em milimolaridade (mM).

Quadro 2 – Quantidades, em volume (V), de trietilamina, de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético (reagente) e de clorofórmio, além da concentração de trietilamina em cada uma das soluções preparadas.

Identificação	V trietilamina (μL)	V reagente (mL)	V CHCl_3 (mL)	Concentração de trietilamina (mM)
Branco	-	3,00	7,00	-
Solução 1	5,00	3,00	7,00	3,57
Solução 2	10,00	3,00	7,00	7,13
Solução 3	15,00	3,00	7,00	10,7
Solução 4	20,00	3,00	7,00	14,3
Solução 5	25,00	3,00	7,00	17,8

As imagens de cada um dos tubos foram analisadas respeitando-se a ordem disposta no Quadro 2, alternando-se as soluções de 2 em 2 minutos. A amostragem de dados foi realizada em intervalos de 1 segundo.

Para verificação da repetitividade do método, as medidas das componentes RGB de cada uma das soluções foram realizadas em triplicatas falsas, ou seja, medindo-se as intensidades de cor da mesma solução por três vezes seguidas, no mesmo experimento. Quanto à reprodutibilidade, as medidas foram tomadas em triplicatas verdadeiras, analisando-se as intensidades de cor para uma mesma concentração de trietilamina, mas a partir de três soluções preparadas separadamente (tempos diferentes de preparo, reagente de Palumbo “novo” etc).

3.1.2 Estimativa da linearidade, dos limites de detecção e quantificação e da exatidão do método

Em tubos de ensaio, foram preparadas onze soluções com concentrações distintas de trietilamina P.A., a partir da adição de volumes entre 3,00 – 24,00 μL da amina em questão, seguida da adição de 3,00 mL de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético, além de um branco contendo somente 3,0 mL desta última solução. Das onze soluções, oito servirão como padrões analíticos para a construção da curva analítica, e as três restantes serão tratadas como amostras cujas concentrações serão determinadas a partir da regressão linear dos pontos desta curva analítica.

Posteriormente, os onze tubos de ensaio foram levados ao banho-maria a 80 °C por 3 minutos. Ao fim, cada um dos tubos recebeu 7,00 mL de clorofórmio P.A.. Todos os volumes foram retirados com o auxílio de pipetas automáticas. O Quadro 3 apresenta os volumes utilizados dos reagentes citados, bem como a concentração de trietilamina presente em cada tubo, expressa em milimolaridade (mM).

Quadro 3 – Curva analítica com oito pontos e amostras a serem analisadas: quantidades, em volume (V), de solução de trietilamina, de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético (reagente) e de clorofórmio, além da concentração de trietilamina em cada uma das soluções preparadas.

Identificação	V trietilamina (μL)	V reagente (mL)	V CHCl_3 (mL)	Concentração de trietilamina (mM)
Branco	-	3,00	7,00	-
Solução 1	3,00	3,00	7,00	2,14
Solução 2	6,00	3,00	7,00	4,28
Solução 3	9,00	3,00	7,00	6,42
Solução 4	12,00	3,00	7,00	8,56
Solução 5	15,00	3,00	7,00	10,7
Solução 6	18,00	3,00	7,00	12,8
Solução 7	21,00	3,00	7,00	15,0
Solução 8	24,00	3,00	7,00	17,1
Amostra 1	7,00	3,00	7,00	4,99
Amostra 2	13,00	3,00	7,00	9,27
Amostra 3	19,00	3,00	7,00	13,5

A análise de imagens se deu através da leitura dos valores RGB de cada uma das soluções, alternando-se os tubos de 1 em 1 minuto, com a amostragem dos dados realizada em intervalos de 1 segundo. Foram realizadas triplicatas falsas.

3.2 Método quantitativo por análise de imagens para piridina

3.2.1 Estimativa da repetitividade e da reprodutibilidade do método

Em tubos de ensaio, foram preparadas cinco soluções com concentrações distintas de piridina P.A. (densidade = 0,9819 g/mL), a partir da adição de volumes entre 2,50 – 12,50 μL da amina, seguida da adição de 600 μL de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético, além de um branco contendo somente 600 μL desta última solução. Em seguida, os seis tubos de ensaio foram levados ao banho-maria a 80 °C por 20 segundos. Ao fim, cada um dos tubos recebeu 5,0 mL de clorofórmio P.A.. Todas as alíquotas foram retiradas com o auxílio de pipetas automáticas. O Quadro 4 apresenta os volumes utilizados dos reagentes citados, bem como a concentração final de piridina presente em cada tubo, expressa em milimolaridade (mM).

Quadro 4 – Quantidades, em volume (V), de piridina, de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético (reagente) e de clorofórmio, além da concentração de piridina em cada uma das soluções preparadas.

Identificação	V piridina (μL)	V reagente (μL)	V CHCl_3 (mL)	Concentração de piridina (mM)
Branco	-	600	5,00	-
Solução 1	2,50	600	5,00	5,54
Solução 2	5,00	600	5,00	11,1
Solução 3	7,50	600	5,00	16,6
Solução 4	10,00	600	5,00	22,1
Solução 5	12,50	600	5,00	27,6

Para a realização da análise de imagens, foram avaliadas as componentes RGB do conteúdo de cada um dos tubos, respeitando a ordem disposta no Quadro 4, alternando-se as soluções de 1 em 1 minuto. A amostragem de dados foi realizada em intervalos de 1 segundo.

Para verificação da repetitividade do método, as medidas das componentes RGB de cada uma das soluções foram realizadas em triplicatas falsas, ou seja, medindo-se as intensidades de cor da mesma solução por três vezes seguidas, no mesmo experimento. Quanto à reprodutibilidade, as medidas foram tomadas em triplicatas verdadeiras, analisando-se as intensidades de cor para uma mesma concentração de piridina, mas a partir de três soluções preparadas separadamente.

3.2.2 Estimativa dos limites de detecção e quantificação, da exatidão e da linearidade/sensibilidade do método

Foi preparada uma solução 0,124 M de piridina P.A. em clorofórmio P.A., a partir da solubilização de 0,4910 g de piridina em 20,0 mL de clorofórmio, em um bécher de 50 mL, com o auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, a solução foi transferida quantitativamente para um balão de 50,00 mL, completou-se o volume com clorofórmio e a solução foi homogeneizada por agitação manual.

Em tubos de ensaio, foram preparadas onze soluções com concentrações distintas de piridina P.A., a partir da adição de volumes entre 40 – 460 μL da solução de piridina 0,124 M, seguida da adição de 600 μL de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético, além de um branco contendo somente 600 μL desta última solução. Das onze soluções, oito servirão como padrões analíticos para a elaboração da curva analítica, e as três restantes serão tratadas como amostras cujas concentrações serão determinadas a partir da regressão linear dos pontos desta curva.

Adiante, os doze tubos de ensaio (onze soluções + um branco) foram aquecidos em banho-maria a 80 °C por 20 segundos. Ao fim, cada um dos tubos recebeu 5,0 mL de clorofórmio P.A.. Todos os volumes foram retirados com o auxílio de pipetas automáticas. O

Quadro 5 apresenta os volumes utilizados dos reagentes citados, bem como a concentração final de piridina presente em cada tubo, expressa em milimolaridade (mM).

Quadro 5 – Curva analítica com 8 pontos e amostras a serem analisadas: quantidades, em volume (V), de solução de piridina 0,124 M em clorofórmio, de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético (reagente) e de clorofórmio, além da concentração final de piridina em cada uma das soluções preparadas.

Identificação	V piridina 0,124 M (μL)	V reagente (μL)	V CHCl₃ (mL)	Concentração final de piridina (mM)
Branco	-	600	5,00	-
Solução 1	40	600	5,00	0,880
Solução 2	100	600	5,00	2,18
Solução 3	160	600	5,00	3,45
Solução 4	220	600	5,00	4,69
Solução 5	280	600	5,00	5,91
Solução 6	340	600	5,00	7,11
Solução 7	400	600	5,00	8,28
Solução 8	460	600	5,00	9,42
Amostra 1	130	600	5,00	2,82
Amostra 2	250	600	5,00	5,30
Amostra 3	370	600	5,00	7,39

A análise de imagens se deu através da leitura dos valores RGB de cada uma das soluções, alternando-se os tubos de 1 em 1 minuto, com a amostragem dos dados realizada em intervalos de 1 segundo. Foram realizadas triplicatas falsas.

3.3 Método quantitativo por análise de imagens para N,N-dimetilanilina

Nesta seção serão descritos os métodos utilizados para a análise de imagens para a determinação de N,N-dimetilanilina, a fim de estimar parâmetros como: repetitividade, reprodutibilidade, exatidão, limites de detecção e quantificação, sensibilidade/linearidade,

comparação da exatidão entre técnicas diferentes e seletividade frente a outras classes de aminas.

Dentre as aminas terciárias utilizadas neste trabalho, a N,N-dimetilanilina era a que se encontrava em maior quantidade para uso. Portanto, para este volume maior de experimentos, foi utilizada a N,N-dimetilanilina como analito nas determinações.

3.3.1 Estimativa da repetitividade e da reprodutibilidade do método

Cinco soluções com concentrações distintas de N,N-dimetilanilina P.A. (densidade = 0,9557 g/mL), foram preparadas, em tubos de ensaio, a partir da adição de volumes entre 7 – 35 μ L da amina, seguida da adição de 600 μ L de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético, além de um branco contendo somente 600 μ L desta última solução. Em seguida, os seis tubos de ensaio foram levados ao banho-maria a 80 °C, por 2 minutos. Ao fim, cada um dos tubos recebeu 5,0 mL de clorofórmio P.A.. Todos os volumes foram retirados com o auxílio de pipetas automáticas. O Quadro 6 apresenta os volumes utilizados dos reagentes citados, bem como a concentração de N,N-dimetilanilina presente em cada tubo, expressa em milimolaridade (mM).

Quadro 6 – Quantidades, em volume, de N,N-dimetilanilina, de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético (reagente) e de clorofórmio, além da concentração de N,N-dimetilanilina em cada uma das soluções preparadas.

Identificação	V N,N-dimetilanilina (μL)	V reagente (μL)	V CHCl₃ (mL)	Concentração de N,N-dimetilanilina (mM)
Branco	-	600	5,00	-
Solução 1	7,00	600	5,00	9,85
Solução 2	14,00	600	5,00	19,7
Solução 3	21,00	600	5,00	29,5
Solução 4	28,00	600	5,00	39,2
Solução 5	35,00	600	5,00	49,0

Quanto à análise de imagens, foram obtidas os valores de RGB para cada um dos tubos, respeitando a ordem disposta no Quadro 6, alternando-se as soluções de 1 em 1 minuto. A amostragem de dados foi realizada em intervalos de 1 segundo.

Para verificação da repetitividade do método, as medidas das componentes RGB de cada uma das soluções foram realizadas em triplicatas falsas, ou seja, medindo-se as intensidades de cor da mesma solução por três vezes seguidas, no mesmo experimento. Quanto à reprodutibilidade, as medidas foram tomadas em triplicatas verdadeiras, analisando-se as intensidades de cor para uma mesma concentração de N,N-dimetilanilina, mas a partir de três soluções preparadas separadamente.

3.3.2 Estimativa da linearidade, dos limites de detecção e quantificação e da exatidão do método

Em tubos de ensaio, foram preparadas onze soluções com concentrações distintas de N,N-dimetilanilina P.A., a partir da adição de volumes entre 5,00 – 33,00 µL da amina citada, seguida da adição de 600 µL de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético, além de um branco contendo somente 600 µL desta solução. Das onze soluções, oito servirão como padrões analíticos para a elaboração da curva analítica, e as três restantes serão tratadas como amostras cujas concentrações serão determinadas a partir da regressão linear dos pontos desta curva.

Em seguida, os doze tubos de ensaio (onze soluções + um branco) foram aquecidos em banho-maria a 80 °C, por 2 minutos. Ao fim, cada um recebeu 5,00 mL de clorofórmio P.A.. Todos os volumes foram retirados com o auxílio de pipetas automáticas. O Quadro 7 apresenta os volumes utilizados dos reagentes citados, bem como a concentração de N,N-dimetilanilina presente em cada tubo, expressa em milimolaridade (mM).

Quadro 7 – Curva analítica com 8 pontos e amostras a serem analisadas: quantidades, em volume (V), de solução de N,N-dimetilanilina, de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético (reagente) e de clorofórmio, além da concentração de N,N-dimetilanilina em cada uma das soluções preparadas.

Identificação	V N,N-dimetilanilina (μL)	V reagente (μL)	V CHCl₃ (mL)	Concentração de N,N-dimetilanilina (mM)
Branco	-	600	5,00	-
Solução 1	5,00	600	5,00	7,04
Solução 2	9,00	600	5,00	12,7
Solução 3	13,00	600	5,00	18,3
Solução 4	17,00	600	5,00	23,9
Solução 5	21,00	600	5,00	29,5
Solução 6	25,00	600	5,00	35,1
Solução 7	29,00	600	5,00	40,6
Solução 8	33,00	600	5,00	46,2
Amostra 1	12,00	600	5,00	16,9
Amostra 2	20,00	600	5,00	28,1
Amostra 3	31,00	600	5,00	43,4

A análise de imagens se deu através da leitura dos valores RGB de cada uma das soluções, alternando-se os tubos de 1 em 1 minuto, com a amostragem dos dados realizada em intervalos de 1 segundo. Foram realizadas triplicatas falsas.

3.3.3 Verificação da seletividade do método frente a outras classes de aminas

3.3.3.1 Estimativa da linearidade, dos limites de detecção e quantificação e da exatidão do método em presença de amina primária (butilamina)

Em tubos de ensaio, foram preparadas onze soluções com concentrações distintas de N,N-dimetilanilina P.A. (densidade = 0,9557 g/mL). As soluções foram preparadas a partir da

adição de 7,00 μL de butilamina P.A. (densidade = 0,738 g/mL), de volumes entre 5,00 – 33,00 μL da amina terciária, seguida da adição de 600 μL de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético, nesta ordem. Das onze soluções, oito servirão como padrões analíticos para a elaboração da curva analítica, e as três restantes serão tratadas como amostras cujas concentrações serão determinadas a partir da regressão linear dos pontos desta curva. A estrutura química da butilamina está ilustrada na Figura 10.



Figura 10 – Estrutura química da butilamina.

Posteriormente, os doze tubos de ensaio (onze soluções + um branco) foram aquecidos em banho-maria a 80 °C, por 2 minutos. Ao fim, cada um recebeu 5,00 mL de clorofórmio P.A.. Todos os volumes foram retirados com o auxílio de pipetas automáticas. O Quadro 8 apresenta os volumes utilizados dos reagentes citados, bem como a concentração de N,N-dimetilanilina presente em cada tubo, expressa em milimolaridade (mM).

Quadro 8 – Curva analítica com 8 pontos e amostras a serem analisadas: quantidades, em volume (V), de butilamina, de solução de N,N-dimetilanilina, de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético (reagente) e de clorofórmio, além da concentração de N,N-dimetilanilina em cada uma das soluções preparadas.

Identificação	V butilamina (μL)	V N,N- dimetilanilina (μL)	V reagente (μL)	V CHCl₃ (mL)	Concentração de N,N-dimetilanilina (mM)
Branco	7,00	-	600	5,00	-
Solução 1	7,00	5,00	600	5,00	7,03
Solução 2	7,00	9,00	600	5,00	12,7
Solução 3	7,00	13,00	600	5,00	18,2
Solução 4	7,00	17,00	600	5,00	23,8
Solução 5	7,00	21,00	600	5,00	29,4
Solução 6	7,00	25,00	600	5,00	35,0
Solução 7	7,00	29,00	600	5,00	40,6
Solução 8	7,00	33,00	600	5,00	46,1
Amostra 1	7,00	12,00	600	5,00	16,8
Amostra 2	7,00	20,00	600	5,00	28,0
Amostra 3	7,00	28,00	600	5,00	39,2

A análise de imagens se deu através da leitura dos valores RGB de cada uma das soluções, alternando-se os tubos de 1 em 1 minuto, com a amostragem dos dados realizada em intervalos de 1 segundo. Foram realizadas triplicatas falsas.

3.3.3.2 Estimativa da linearidade, dos limites de detecção e quantificação e da exatidão do método em presença de amina secundária (morfolina)

Foi realizado o mesmo procedimento descrito em 3.3.4.1, contudo foi utilizada uma amina secundária em vez da butilamina: a tetraidro-1,4-oxazina, mais conhecida como morfolina (Figura 11). Foram considerados os mesmos volumes descritos em 3.3.4.1 para todos os reagentes.

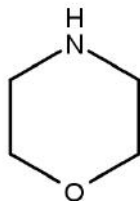


Figura 11 – Estrutura química da morfolina (tetraidro-1,4-oxazina).

3.3.4 Comparação da exatidão entre análise de imagens e espectrometria na região do ultravioleta-visível

Dispondo-se das mesmas soluções e amostras utilizadas na seção 3.3.2, foi construída uma curva analítica a partir das oito soluções descritas no Quadro 7, com posterior determinação da concentração das três amostras descritas no mesmo quadro, através da regressão linear dos pontos da curva analítica citada. Entretanto, as análises foram realizadas com o uso da espectrometria na região de ultravioleta-visível, com o auxílio de um espectrômetro Bioespectro, modelo SP-22.

Inicialmente, para tornar conhecido o comprimento de onda no qual há um máximo de absorção ($\lambda_{\text{ótimo}}$), realizou-se a varredura da Solução 8 (Quadro 7), de 360 a 740 nm, obtendo-se os valores de absorvância de 10 em 10 nm. O branco utilizado foi o mesmo branco descrito no Quadro 7.

Portando-se o valor de $\lambda_{\text{ótimo}} = 390$ nm, foi medida a absorvância neste comprimento de onda, em triplicata, de cada uma das soluções de N,N-dimetilanilina, com uso do branco, cujas composições estão detalhadas no Quadro 7.

3.4 Caracterização dos produtos e do reagente de Palumbo por espectrometria na região do ultravioleta-visível

Foram utilizadas 5 amostras para a caracterização por espectrometria da região do ultravioleta-visível, com os seus respectivos brancos, todos descritos a seguir:

Amostra A: solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético recém-preparada; branco: anidrido acético P.A.;

Amostra B: solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético após 110 dias de preparo; branco: anidrido acético P.A.;

Amostra C: produto formado a partir da reação de 20 μL de trietilamina P.S. com 600 μL da solução utilizada na Amostra 1, após 3 minutos em banho-maria a 80 °C, com posterior adição de 5,0 mL de clorofórmio P.A.; branco: 600 μL de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético, após 3 minutos em banho-maria a 80 °C, com posterior adição de 5,0 mL de clorofórmio P.A.;

Amostra D: produto formado a partir da reação de 15 μL de N,N-dimetilanilina P.A. com 600 μL da solução utilizada na Amostra 1, após 3 minutos em banho-maria a 80 °C, com posterior adição de 5,0 mL de clorofórmio P.A.; branco: 600 μL de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético após 3 minutos em banho-maria a 80 °C, com posterior adição de 5,0 mL de clorofórmio P.A.;

Amostra E: produto formado a partir da reação de 5 μL de piridina P.A. com 600 μL da solução utilizada na Amostra 1, após 1 minuto em banho-maria a 80 °C, com posterior adição de 5,0 mL de clorofórmio P.A.; branco: 600 μL de solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético após 3 minutos em banho-maria a 80 °C, com posterior adição de 5,0 mL de clorofórmio P.A.;

As amostras foram analisadas com o auxílio de um espectrômetro ultravioleta-visível Bioespectro, modelo SP-22. Foi realizada a varredura de cada uma das amostras, considerando os seus respectivos brancos, de 330 a 740 nm, obtendo-se os valores de absorvância de 10 em 10 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Método quantitativo por análise de imagens para trietilamina

4.1.1 Estimativa da repetitividade e reprodutibilidade do método

O software RGBView avalia a variação das componentes R, G e B de uma região delimitada da imagem, em função do tempo, além de fornecer automaticamente a variação da média aritmética entre essas componentes. Foi obtido o seguinte perfil para as componentes R, G, B e sua média aritmética, ao longo do tempo, para as soluções de trietilamina e o branco de análise (Figura 12):

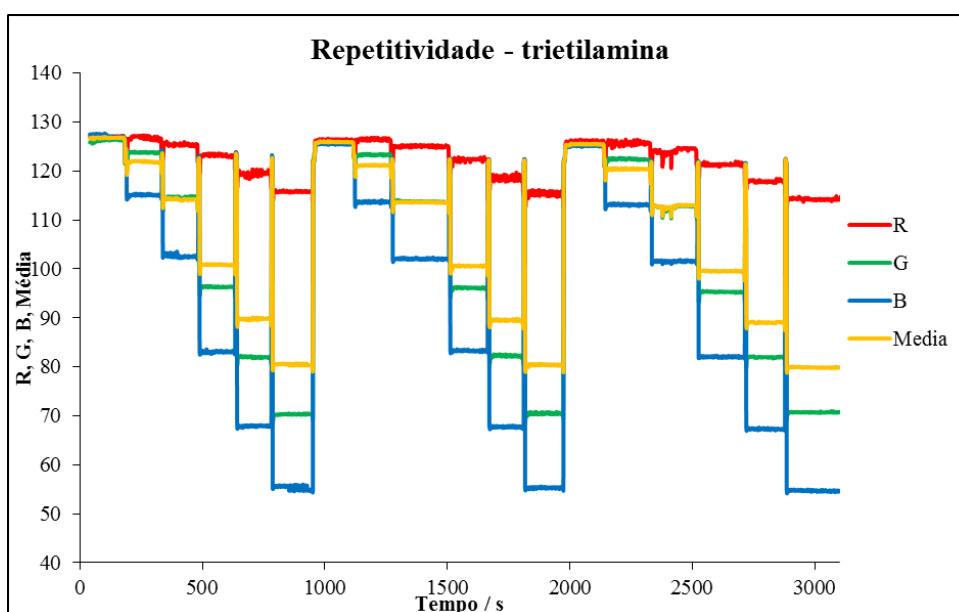


Figura 12 – Resposta da variação das componentes R, G, B e sua respectiva média aritmética, ao longo do tempo, para as diferentes soluções de trietilamina e o branco de análise.

É importante destacar que os valores de R, G e B, e consequentemente, a sua média aritmética, são adimensionais.

Para melhor entendimento sobre o comportamento das componentes RGB, a Figura 13 mostra imagens das soluções e do branco, esclarecendo as variações de R,G e B observadas. Para o branco, no qual a solução é transparente, são observados os maiores valores de R, G e diminuem com o aumento da intensidade da cor. Vale lembrar que valores máximos de vermelho, verde e azul compõem a cor branca, enquanto que valores mínimos correspondem ao preto (UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE, 2014).

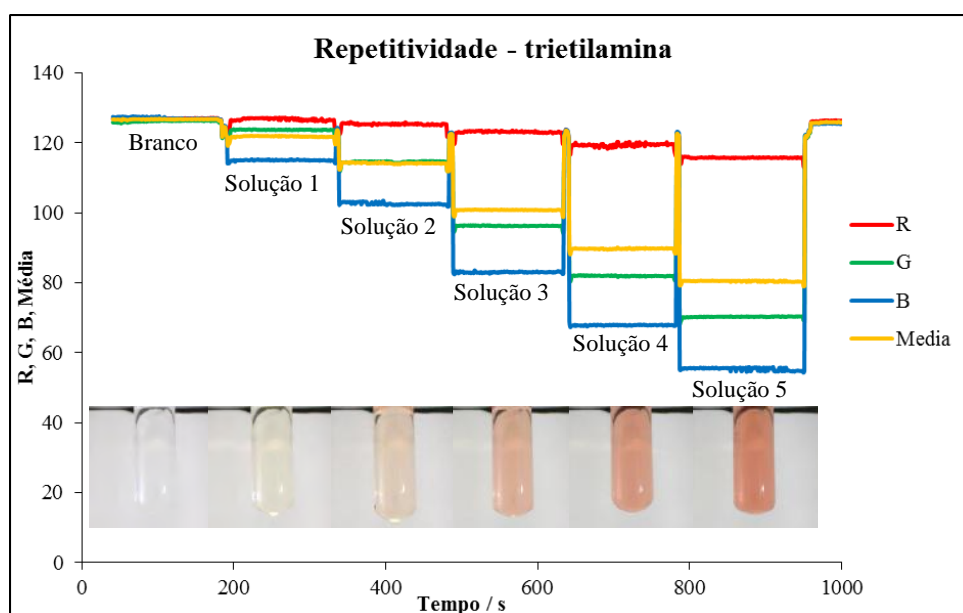


Figura 13 – Esquema do perfil de cor observado e a sua correlação com as imagens analisadas.

O aumento momentâneo do valor de RGB observado em cada intervalo das soluções corresponde à realização das trocas dos tubos: como a amostragem era realizada em intervalos de 1 segundo, houve tempo suficiente para registrar os dados entre a troca dos tubos. Logo, o *software* mediu as componentes RGB do fundo branco, que aparecia para a *webcam* nesses entretempos.

Como forma de associar os valores de RGB obtidos para cada solução, de forma que os valores de RGB aumentem com a concentração do analito, escolheu-se trabalhar com as variações de RGB em relação ao branco, considerando essas variações como a resposta RGB para cada concentração. Esta proposta foi utilizada em todos os experimentos deste trabalho, para todas as componentes RGB, e suas respectivas médias. A Figura 14 ilustra a ideia adotada, em particular para a componente B.

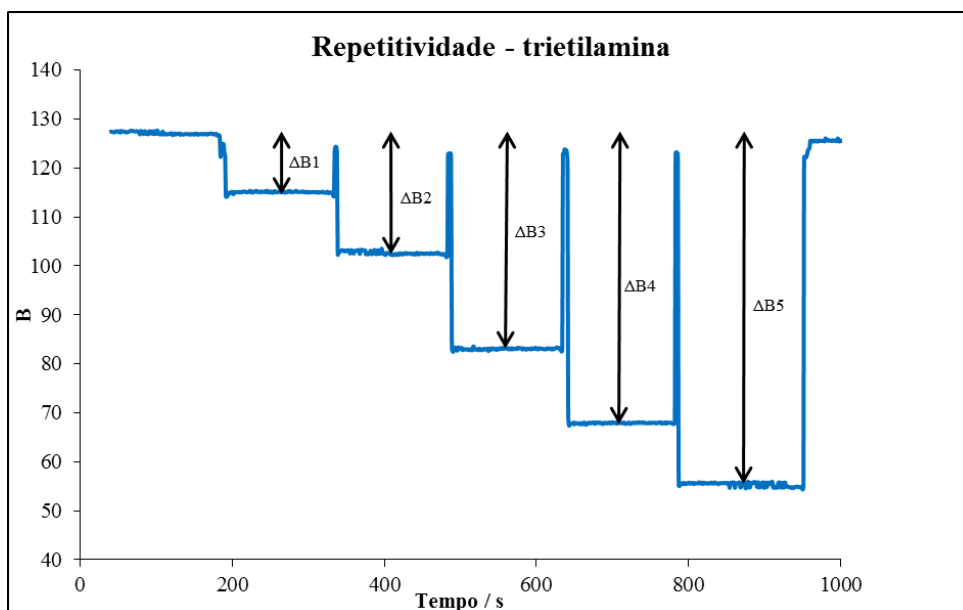


Figura 14 – Proposta utilizada para considerar respostas de RGB que aumentem com a concentração do analito (exemplo: componente B).

A resposta RGB para o branco foi ajustada como zero, e assim, o cálculo da variação da componente para cada solução foi realizado com o auxílio da Equação 7:

$$\Delta(R, G, B, \text{Média})_{\text{solução } n} = (R, G, B, \text{Média})_{\text{branco}} - (R, G, B, \text{Média})_{\text{solução } n} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde $(R, G, B, \text{Média})_{\text{solução } n}$ é a média aritmética de 50 valores de RGB e média que constituem cada patamar, correspondente à solução n. E $(R, G, B, \text{Média})_{\text{branco}}$ é a média aritmética de 50 valores de RGB e média que constituem o patamar do branco.

Desta forma, para as triplicatas falsas, foram construídos gráficos que mostram os valores de ΔR , ΔG , ΔB , $\Delta \text{Média}$ em função da concentração de trietilamina, expressa em molaridade. Os intervalos de confiança também estão expressos nos gráficos, para o nível de confiança igual a 95%. Todos os gráficos, para cada uma das componentes, estão ilustrados nas Figuras 15-18.

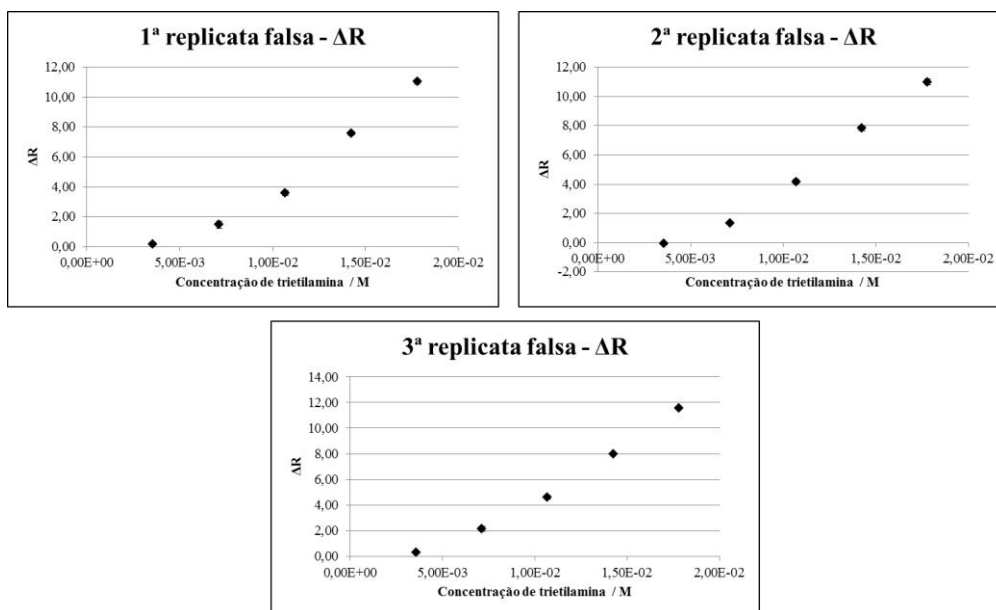


Figura 15 – Gráficos de ΔR contra concentração de trietilamina (M), das três triplicatas falsas.

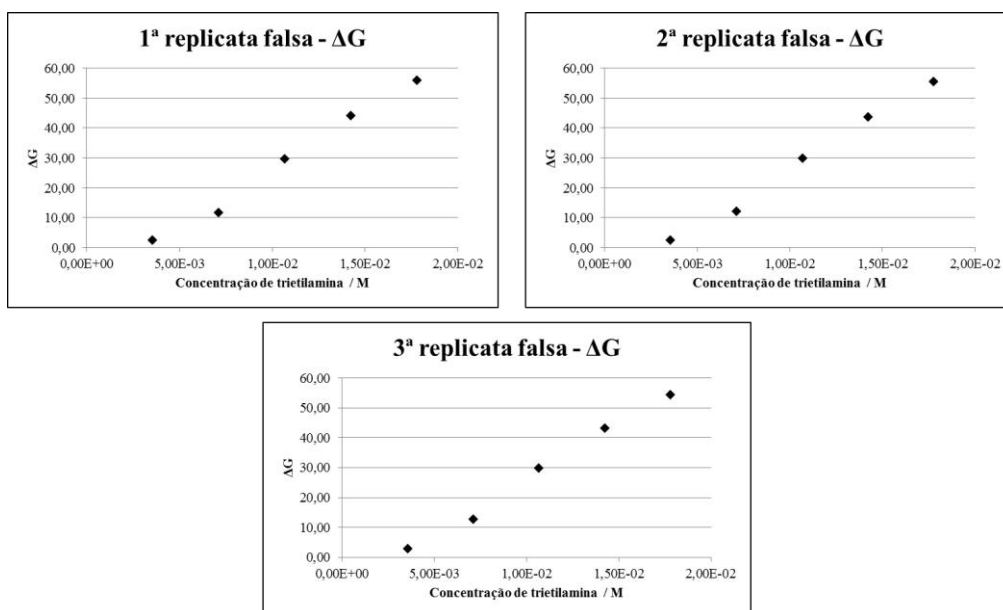


Figura 16 – Gráficos de ΔG contra concentração de trietilamina (M), das três triplicatas falsas.

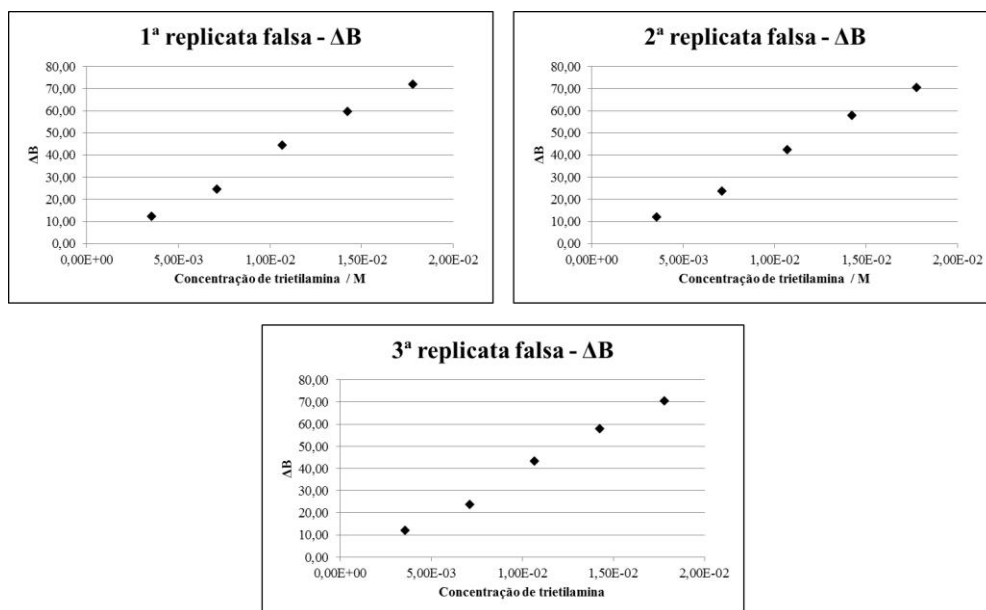


Figura 17 – Gráficos de ΔB contra concentração de trietilamina (M), das três triplicatas falsas.

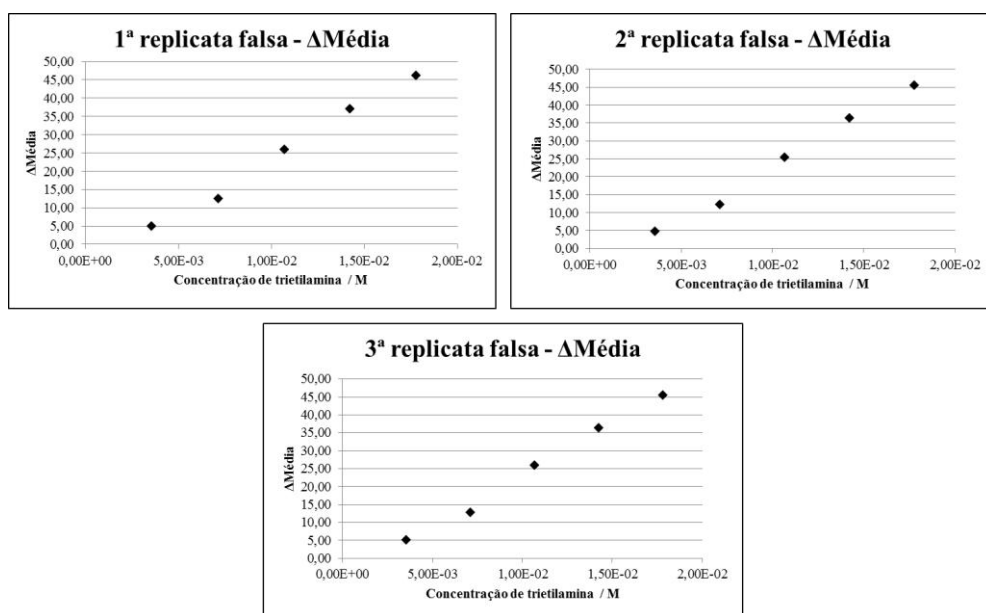


Figura 18 – Gráficos de $\Delta Média$ contra concentração de trietilamina (M), das três triplicatas falsas.

Para verificar a repetitividade do método, foi utilizada a média aritmética entre as três triplicatas falsas para cada componente de cor, obtendo-se os gráficos apresentados na Figura 19. Os gráficos expressam também o intervalo de confiança de cada valor médio obtido, para um nível de confiança igual a 95%.

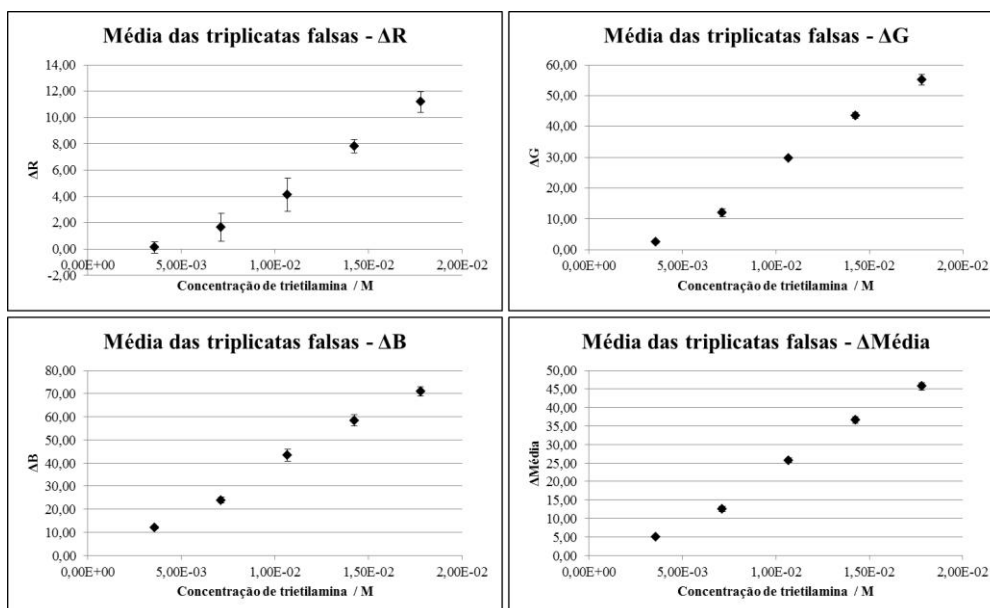


Figura 19 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas falsas, em função da concentração de trietilamina (M).

Visualmente, o método apresenta repetitividade quando há uso das componentes G, B e Média, pois, para cada concentração de trietilamina, a resposta (ΔG , ΔB ou $\Delta Média$) pode ser considerada diferente estatisticamente das outras, visto que o seu intervalo de confiança não invade as outras respostas, com o nível de 95% de confiança. Os intervalos de confiança também mostram que os sinais G e B não sofreram variações significativas ao longo do tempo. O contrário é observado para a componente R: a resposta ΔR , para uma dada concentração, pode assumir valores que estão relacionados com outra concentração de trietilamina.

Para a reprodutibilidade, ao serem analisadas a média aritmética dos valores de ΔR , ΔG , ΔB e $\Delta Média$ para as suas triplicatas verdadeiras, percebe-se que os intervalos de confiança para cada determinação fazem com que não haja diferença estatística entre os cinco pontos, levando à conclusão de que o método não é reprodutível para trietilamina, para o uso de qualquer componente de cor. Os gráficos das triplicatas verdadeiras estão apresentados na Figura 20.

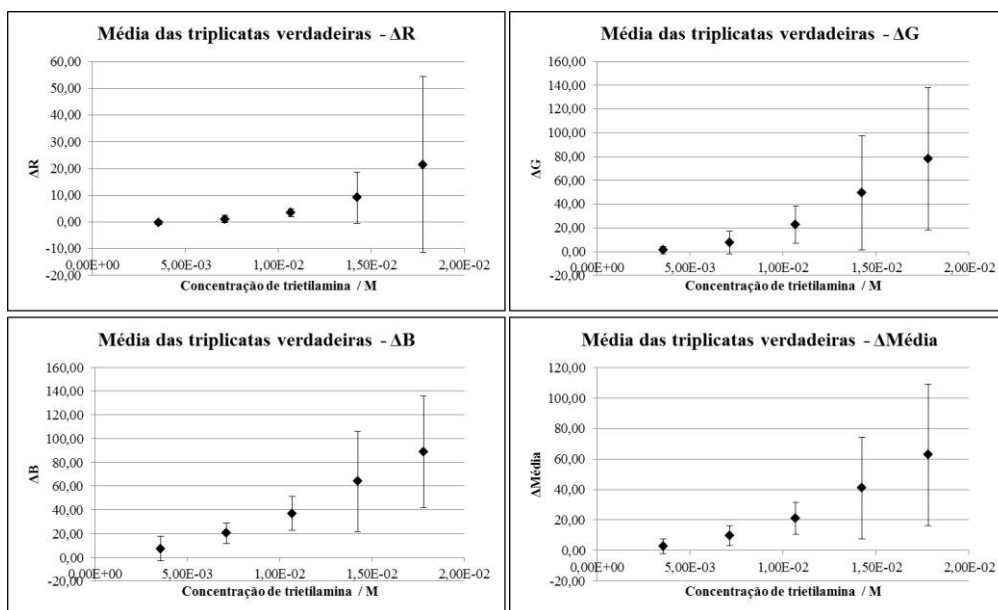


Figura 20 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas verdadeiras, em função da concentração de trietilamina (M).

4.1.2 Estimativa da linearidade, dos limites de detecção e quantificação e da exatidão do método

Considerando as oito soluções de trietilamina preparadas, conforme descrito em 3.1.2, com o uso da Equação 7, foram obtidas quatro curvas analíticas: uma para cada componente de cor e uma para a sua média aritmética. Os valores de ΔR , ΔG , ΔB e $\Delta Média$ representam a média aritmética entre as suas respectivas triplicatas falsas. Os gráficos estão apresentados na Figura 21.

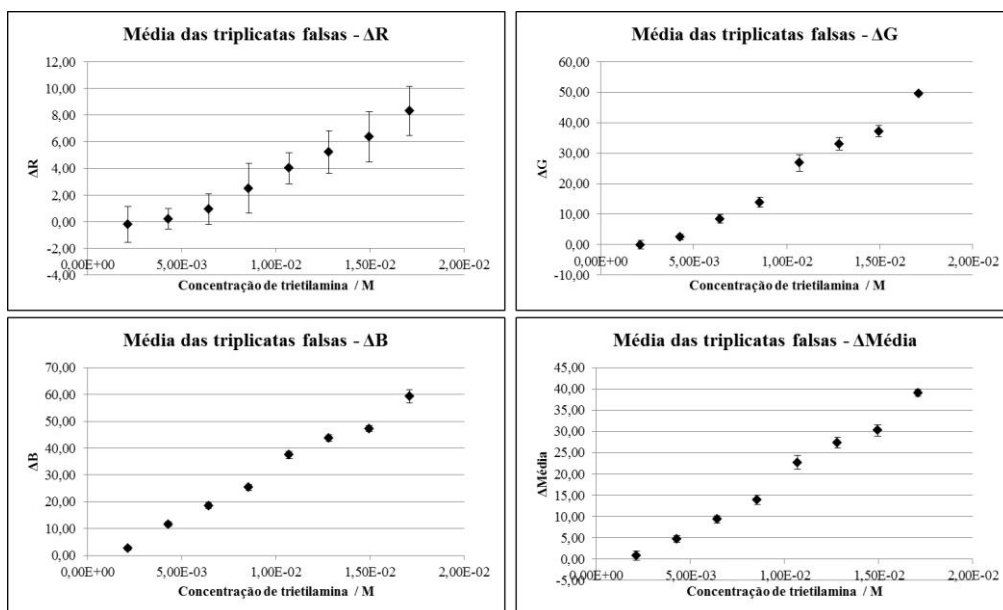


Figura 21 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas falsas, em função da concentração de trietilamina (M), para a elaboração de suas respectivas curvas analíticas.

Foi realizada uma regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, para cada conjunto de dados. As equações das retas obtidas a partir da regressão estão apresentadas no Quadro 9. O coeficiente de correlação de Pearson, ou somente coeficiente de correlação, r , também está apresentado no mesmo quadro, referente a cada conjunto de dados.

Quadro 9– Equações das retas e coeficientes de correlação obtidos a partir da regressão linear dos dados, pelo método dos mínimos quadrados, de cada componente de cor em função da concentração de trietilamina.

Componente	Equação da reta	Coeficiente de correlação (r)
R	$y = 582,15x - 2,1835$	0,9901
G	$y = 3381,8x - 11,153$	0,9883
B	$y = 3687,5x - 4,7194$	0,9957
Média	$y = 2550,5x - 6,0187$	0,9979

Sabe-se que a regressão linear de um conjunto de dados fornece equações para a reta do tipo $y = a + bx$, onde, para o presente caso, $y = \Delta(R,G,B \text{ ou Média})$; x = concentração de trietilamina (M); e b e a são os coeficientes angular e linear da reta, respectivamente.

O método se torna mais sensível à medida que pequenas variações da concentração resultam em maior variação da resposta, ou seja, quando há maior inclinação da reta obtida, o coeficiente angular b (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, 2010). Diante desta consideração, tem-se que a sensibilidade do método é maior quando há uso da componente B ($b = 3697,5 \text{ M}^{-1}$), e é menor para a componente R ($b = 582,15 \text{ M}^{-1}$). A sensibilidade pode ser estimada desta maneira, visto que a correlação linear entre os dados, para todas as componentes, é intensa, ou dita muito forte ($r > 0,91$) (BRITO et al., 2003).

Foram estimados os limites de detecção e quantificação, a partir das Equações 2 e 5, considerando o valor médio de $\Delta(R,G,B \text{ e Média})$ para o branco igual a zero. Ressalta-se a tentativa de estimar esses parâmetros, visto que não se está trabalhando com o número mínimo recomendado de replicatas, que é sete, mas sim, com três (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, 2010). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de trietilamina por análise de imagens, para cada componente de cor, estão apresentados no Quadro 10.

Quadro 10– Limites estimados de detecção e quantificação de trietilamina por análise de imagens, em termos de concentração (mM), para cada componente de cor.

Componente	Limite de detecção (mM)	Limite de quantificação (mM)
R	6,26	16,5
G	3,64	5,02
B	1,67	3,24
Média	2,83	4,76

A técnica de análise de imagens, para a determinação de trietilamina, apresenta os menores limites de detecção e quantificação para o uso da componente B, conforme apresentado no Quadro 10.

A exatidão do método se deu pelo cálculo da recuperação/tendência (%) das três amostras de trietilamina, cujas concentrações verdadeiras estão no Quadro 3, que tiveram suas cores medidas por análise de imagens, e a partir da regressão linear da curva analítica, foram

determinadas as concentrações de trietilamina em cada uma delas. A recuperação (%) foi calculada com o auxílio da Equação 6. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Recuperação analítica de amostras de trietilamina, a partir da curva analítica para cada componente de cor, onde $C_{\text{calculada}}$ = concentração calculada de trietilamina (mM); $C_{\text{verdadeira}}$ = concentração verdadeira de trietilamina (mM); Rec. = recuperação (%).

Identificação	$C_{\text{calculada}}$ (mM)	$C_{\text{verdadeira}}$ (mM)	Rec. (%)
<i>Componente: R</i>			
Amostra 1	5,23	4,99	104,70
Amostra 2	9,98	9,27	107,62
Amostra 3	15,1	13,5	111,85
<i>Componente: G</i>			
Amostra 1	5,72	4,99	114,61
Amostra 2	9,91	9,27	106,87
Amostra 3	15,5	13,5	114,82
<i>Componente: B</i>			
Amostra 1	6,20	4,99	124,18
Amostra 2	1,06	9,27	113,94
Amostra 3	15,8	13,5	116,56
<i>Componente: Média</i>			
Amostra 1	5,87	4,99	117,46
Amostra 2	1,02	9,27	109,79
Amostra 3	15,6	13,5	115,06

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, percebe-se que a técnica de análise de imagens superestimou as concentrações de trietilamina, fornecendo resultados maiores do que os verdadeiros, isto é, a recuperação foi maior que 100%. Porém, vale ressaltar que a técnica conseguiu recuperar bem as informações das amostras ditas desconhecidas. Para saber qual das componentes desempenhou melhor recuperação, pode-se

calcular o desvio quadrático médio (RMSD – *Root-Mean-Square Deviation*) para a predição das concentrações, considerando cada conjunto de recuperações, através da Equação 8: O RMSD representa o desvio padrão amostral das diferenças entre valores preditos (calculados) e verdadeiros.

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^3 (C_{\text{verdadeira}}^i - C_{\text{calculada}}^i)^2}{n}} \quad (\text{Equação 8})$$

Onde:

$C_{\text{verdadeira}}^i$ = concentração verdadeira de trietilamina (M) na amostra i;

$C_{\text{calculada}}^i$ = concentração calculada de trietilamina (M) na amostra i;

n = número total de amostras.

Os resultados, apontados na Tabela 4, mostram que o uso da componente R forneceu melhor recuperação, ou maior exatidão, em termos coletivos, com $\text{RMSD} = 1,02 \times 10^{-3} \text{ M}$.

Tabela 4 – Valores para o desvio quadrático médio (RMSD) sobre a predição da concentração de trietilamina para todas as componentes de cor e sua média.

Componente	RMSD ($\times 10^{-3} \text{ M}$)
R	1,02
G	1,29
B	1,65
Média	1,38

4.2 Método quantitativo por análise de imagens para piridina

4.2.1 Estimativa da repetitividade e reprodutibilidade do método

Fazendo-se uso da Equação 7, foram obtidos, para a média entre as triplicatas falsas, gráficos que mostram os valores de ΔR , ΔG , ΔB , $\Delta Média$ em função da concentração de piridina, expressa em molaridade. Os intervalos de confiança também estão expressos nos gráficos, para o nível de confiança igual a 95%. Os gráficos estão apresentados na Figura 22.

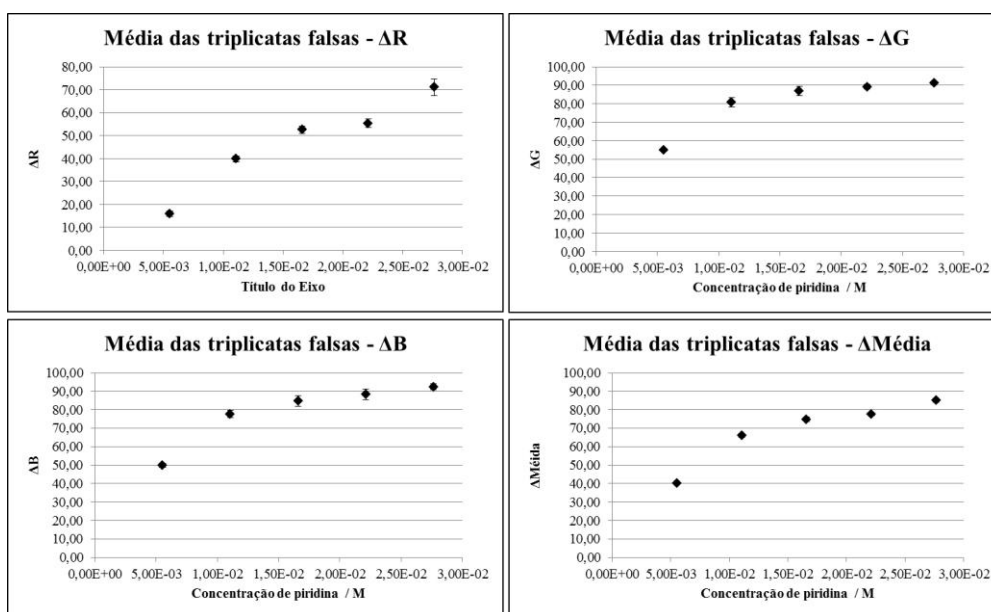


Figura 22 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas falsas, em função da concentração de piridina (M).

Realizando-se uma análise visual dos dados, o método apresenta repetitividade, pois os valores médios de ΔR , ΔG , ΔB e $\Delta Média$ possuem intervalos de confiança relativamente pequenos, ou seja, o sinal RGB não sofreu significativas variações ao longo do tempo.

Para a estimativa da reprodutibilidade, considerando a análise de triplicatas verdadeiras, o método não é reprodutível, dentro das condições realizadas, conforme os resultados apresentados na Figura 23.

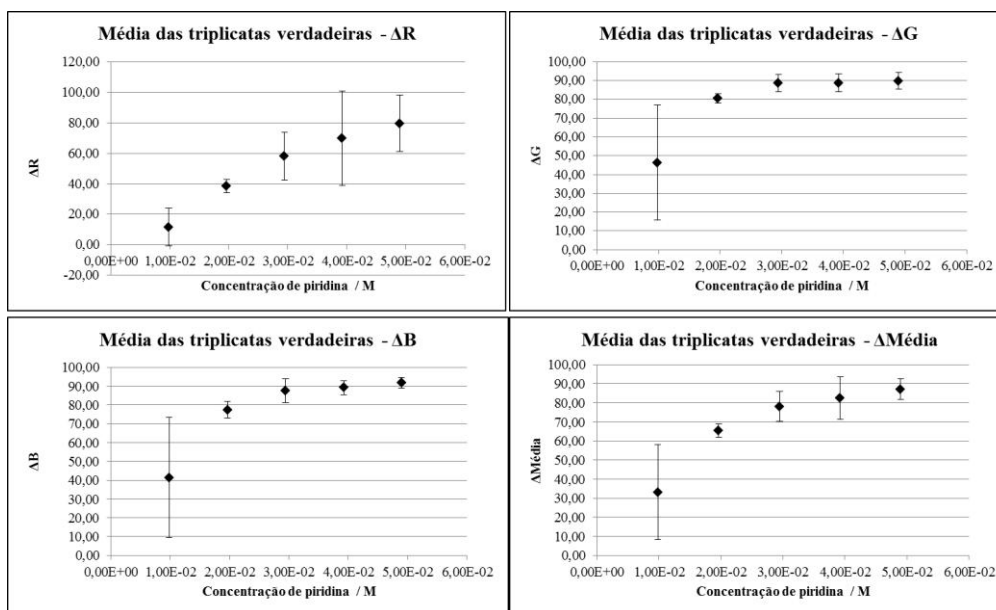


Figura 23 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas verdadeiras, em função da concentração de piridina (M).

4.2.2 Estimativa da linearidade, dos limites de detecção e quantificação e da exatidão do método

A partir da medida das componentes das oito soluções de piridina, preparadas conforme descrito em 3.2.2, com o uso da Equação 7, foram obtidas quatro curvas analíticas. Os valores de ΔR , ΔG , ΔB e $\Delta Média$ representam a média aritmética entre as suas respectivas triplicatas falsas. Os gráficos estão apresentados na Figura 24.

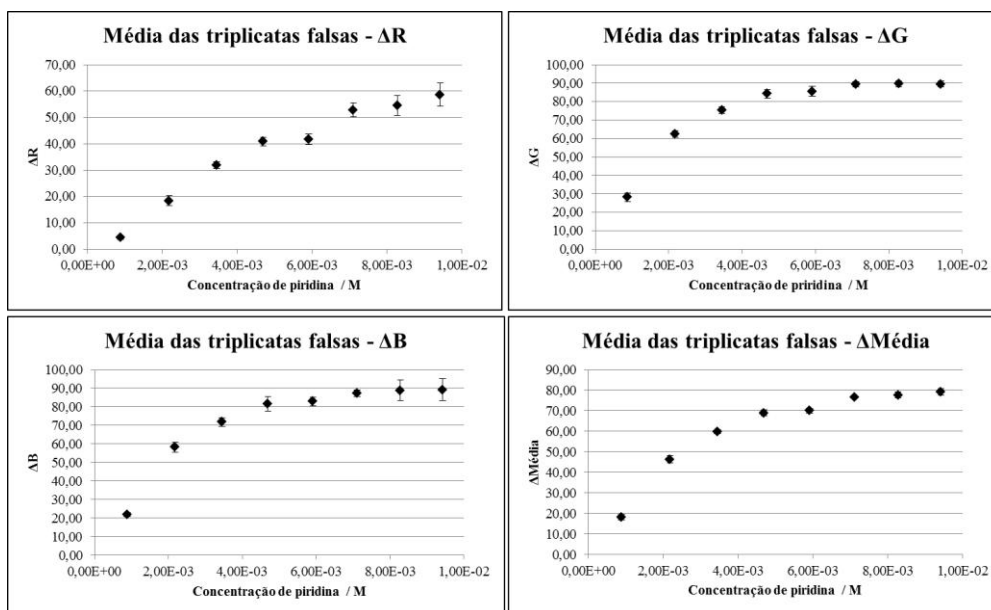


Figura 24 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas falsas, em função da concentração de piridina (M), para a elaboração de suas respectivas curvas analíticas.

Foi realizada uma regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, para cada conjunto de dados. As equações das retas obtidas a partir da regressão estão apresentadas no Quadro 11. Os coeficientes de correlação, R, também estão apresentados no mesmo quadro.

Quadro 11– Equações das retas e coeficientes de correlação obtidos a partir da regressão linear dos dados, pelo método dos mínimos quadrados, de cada componente de cor em função da concentração de piridina.

Componente	Equação da reta	Coeficiente de correlação (r)
R	$y = 6118,5x + 5,8465$	0,9689
G	$y = 6012,7x + 44,071$	0,8428
B	$y = 6637,6x + 37,92$	0,8591
Média	$y = 6256,3x + 29,279$	0,8973

A componente de cor que apresentou melhor linearidade, em termos de coeficiente de correlação, foi a componente R. Embora os seus dados apresentem correlação relativamente forte (BRITO et al., 2003), as sensibilidades não são passíveis de comparações, visto que os

coeficientes angulares são muito próximos. Além disso, percebe-se, na Figura 24, que os dados para as componentes G, B e Média apresentam uma tendência: a partir da quarta concentração de piridina, não há mudanças significativas sobre o sinal. Isto pode estar relacionado a uma limitação da reação, pois o produto da reação possui coloração violeta intensa, e segundo a análise de imagens, não há diferença entre as cores destes produtos mais concentrados, considerando as componentes verde e azul. Caso fosse limitação do instrumento, não seria possível observar a linearidade, relativamente maior, que há para a componente vermelha.

Foram estimados os limites de detecção e quantificação, a partir das Equações 2 e 5, considerando o valor médio de $\Delta(R,G,B \text{ e Média})$ para o branco igual a zero. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de piridina por análise de imagens, em termos de RGB e Média, estão apresentados no Quadro 12.

Quadro 12– Limites estimados de detecção e quantificação de piridina por análise de imagens, em termos de RGB e Média, para cada componente de cor.

Componente	Limite de detecção	Limite de quantificação
R	1,14	5,77
G	1,03	5,21
B	1,88	9,51
Média	1,32	6,66

Ao serem convertidos em termos de concentração de piridina, através das equações presentes no Quadro 11, os limites de detecção e de quantificação assumem valores negativos, pois os coeficientes lineares das retas são positivos e maiores que os valores de LD e LQ (em termos de RGB). Sendo assim, será considerado o mesmo limite de quantificação, para todas as curvas, como a menor concentração de piridina utilizada: $8,80 \times 10^{-4}$ M.

A exatidão do método foi estimada pelo cálculo da recuperação/tendência (%) das três amostras de piridina, cujas concentrações verdadeiras estão no Quadro 5, que tiveram suas cores medidas por análise de imagens, e a partir da regressão linear da curva analítica, foram determinadas as concentrações de piridina em cada uma delas. A recuperação (%) foi calculada com o auxílio da Equação 6. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Recuperação analítica de amostras de piridina, a partir da curva analítica para cada componente de cor, onde $C_{\text{calculada}}$ = concentração calculada de piridina (mM); $C_{\text{verdadeira}}$ = concentração verdadeira de piridina (mM); Rec. = recuperação (%).

Identificação	$C_{\text{calculada}}$ (mM)	$C_{\text{verdadeira}}$ (mM)	Rec. (%)
<i>Componente: R</i>			
Amostra 1	2,94	2,82	104,56
Amostra 2	6,04	5,30	113,87
Amostra 3	7,92	7,69	102,97
<i>Componente: G</i>			
Amostra 1	4,29	2,82	152,33
Amostra 2	7,19	5,30	135,33
Amostra 3	7,59	7,69	98,62
<i>Componente: B</i>			
Amostra 1	4,50	2,82	159,69
Amostra 2	7,15	5,30	134,74
Amostra 3	7,81	7,69	101,57
<i>Componente: Média</i>			
Amostra 1	3,93	2,82	139,42
Amostra 2	6,80	5,30	128,26
Amostra 3	7,78	7,69	101,13

Os resultados apresentados na Tabela 5 indicam, visualmente, que a componente R obteve melhor exatidão relativa (recuperação mais próxima de 100%). Esta consideração fica mais evidente ao serem comparados os valores para RMSD (Equação 8) na predição das concentrações das amostras 1, 2 e 3 a partir das curvas analíticas (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores para o desvio quadrático médio (RMSD) sobre a predição da concentração de piridina, para todas as componentes de cor e sua média.

Componente	RMSD ($\times 10^{-4}$ M)
R	4,51
G	13,8
B	14,4
Média	10,8

4.3 Método quantitativo por análise de imagens para N,N-dimetilanilina

4.3.1 Estimativa da repetitividade e reprodutibilidade do método

Com o uso da Equação 7 sobre os valores de RGB e média, para cada concentração de N,N-dimetilanilina, considerando as triplicatas falsas, construiu-se quatro gráficos (Figura 25) que mostram os valores de ΔR , ΔG , ΔB , Δ Média em função da concentração da amina em questão, expressa em molaridade. Os intervalos de confiança também estão expressos nos gráficos, para o nível de confiança igual a 95%.

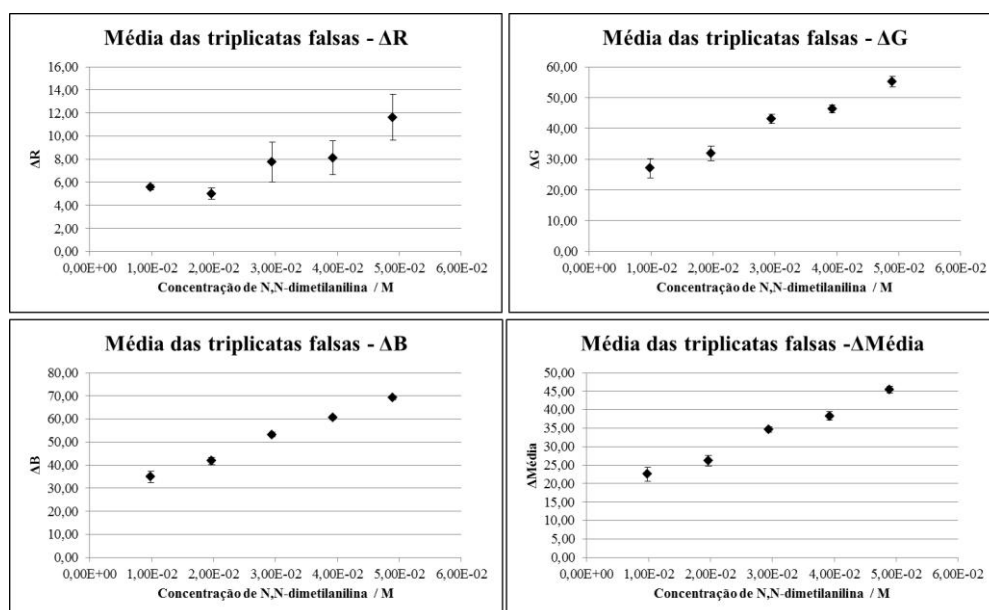


Figura 25 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas falsas, em função da concentração de N,N-dimetilanilina (M).

A partir da análise visual dos gráficos, o método utilizando a componente R como resposta para uma dada concentração de N,N-dimetilanilina apresentou menor repetitividade, visto que os valores de R sofreram variações significativas ao longo do tempo de análise.

Os resultados obtidos para a análise da reprodutibilidade estão representados pelos gráficos da Figura 26. Assim como para trietilamina e piridina, a análise de N,N-dimetilanilina não é reprodutível, pois para um nível de confiança igual a 95%, as concentrações da amina podem assumir valores de RGB e média muito dispersos entre si (amplo intervalo de confiança).

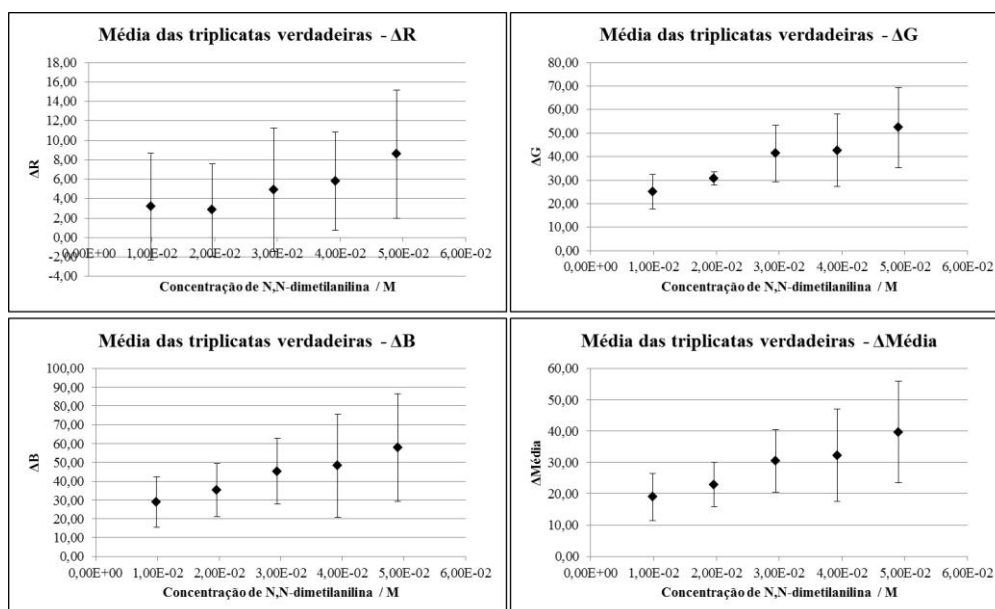


Figura 26 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas verdadeiras, em função da concentração de N,N-dimetilanilina (M).

4.3.2 Estimativa da linearidade, dos limites de detecção e quantificação e da exatidão do método

A Figura 27 mostra os gráficos obtidos a partir da análise de imagens das oito soluções de N,N-dimetilanilina. Os intervalos de confiança também estão expressos em cada gráfico.

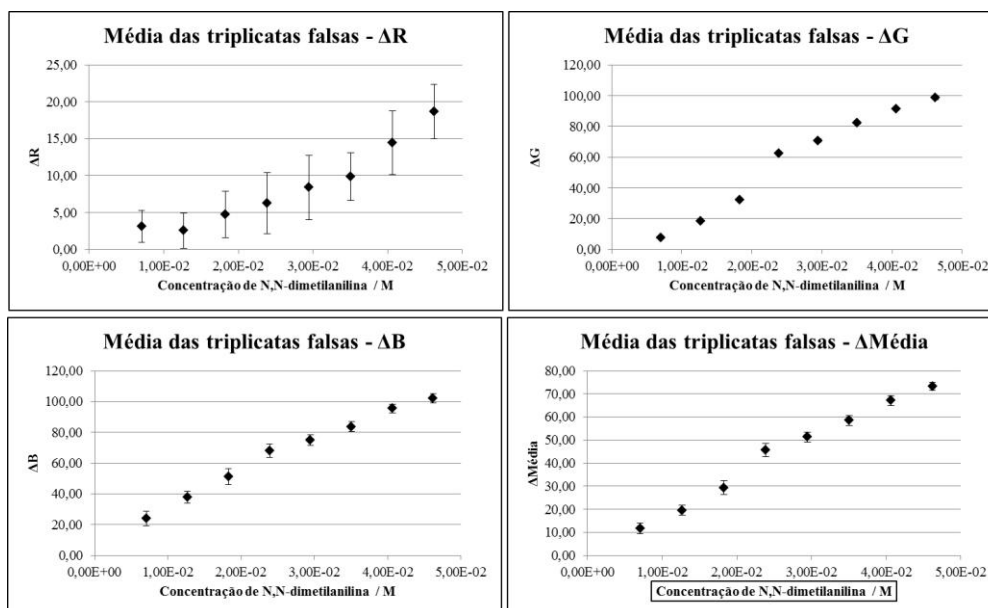


Figura 27 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas falsas, em função da concentração de N,N-dimetilanilina (M), para a elaboração de suas respectivas curvas analíticas.

Com a elaboração das curvas analíticas a partir de oito soluções de N,N-dimetilanilina, através da análise imagens, foi realizada a regressão linear de cada conjunto de pontos, para as três componentes de cor e sua média. A equação de cada reta está apresentada no Quadro 13.

Quadro 13– Equações das retas e coeficientes de correlação obtidos a partir da regressão linear dos dados, pelo método dos mínimos quadrados, de cada componente de cor em função da concentração de N,N-dimetilanilina.

Componente	Equação da reta	Coeficiente de correlação (r)
R	$y = 395,29x - 2,031$	0,9576
G	$y = 2469,7x - 7,7995$	0,9828
B	$y = 1998x + 13,942$	0,9921
Média	$y = 1621x + 1,3704$	0,9922

De acordo com o Quadro 13, a componente B e a média entre as componentes RGB forneceram maiores linearidades, ou seja, maiores correlações lineares entre a resposta (sinal) e a concentração de N,N-dimetilanilina. Dentre elas, a componente B oferece maior sensibilidade ao método. Entretanto, para todas as componentes de cor, o uso do verde aponta maior sensibilidade.

Foram estimados os limites de detecção e quantificação, a partir das Equações 2 e 5, considerando o valor médio de $\Delta(R,G,B \text{ e Média})$ para o branco igual a zero. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de N,N-dimetilanilina por análise de imagens, em termos de RGB e Média, estão apresentados no Quadro 14

Quadro 14– Limites estimados de detecção e quantificação de N,N-dimetilanilina por análise de imagens, em termos de concentração (mM), para cada componente de cor.

Componente	Limite de detecção (mM)	Limite de quantificação (mM)
R	10,1	30,4
G	3,43	4,53
B	*	7,04
Média	*	7,04

* não expressos

Para as componentes B e Média, os limites de detecção e quantificação, expressos em termos de sinal B e Média, ao serem convertidos em concentração apresentaram valores negativos. Portanto, não foram expressos os limites de detecção para essas componentes, e o limite de quantificação foi considerado como o menor padrão utilizado na curva analítica.

A exatidão do método foi estimada pelo cálculo da recuperação/tendência (%) das três amostras de N,N-dimetilamina, cujas concentrações verdadeiras estão no Quadro 7. A recuperação (%) foi calculada com o auxílio da Equação 6. Os resultados estão apresentados na Tabela 7. Os valores para RMSD na predição da concentração das amostras estão presentes na Tabela 8.

Tabela 7 – Recuperação analítica de amostras de N,N-dimetilanilina, a partir da curva analítica para cada componente de cor, onde $C_{calculada}$ = concentração calculada de N,N-dimetilanilina (M); $C_{verdadeira}$ = concentração verdadeira de N,N-dimetilanilina (M); Rec. = recuperação (%).

Identificação	$C_{calculada}$ (mM)	$C_{verdadeira}$ (mM)	Rec. (%)
<i>Componente: R</i>			
Amostra 1	8,07	16,9	47,86
Amostra 2	20,6	28,1	73,45
Amostra 3	49,1	43,4	113,03
<i>Componente: G</i>			
Amostra 1	15,3	16,9	90,98
Amostra 2	27,0	28,1	96,19
Amostra 3	42,8	43,4	98,61
<i>Componente: B</i>			
Amostra 1	27,2	16,9	161,08
Amostra 2	30,5	28,1	108,72
Amostra 3	18,6	43,4	42,92
<i>Componente: média</i>			
Amostra 1	14,9	16,9	88,14
Amostra 2	27,9	28,1	99,38
Amostra 3	43,5	43,4	100,24

Tabela 8 – Valores para o desvio quadrático médio (RMSD) sobre a predição da concentração de N,N-dimetilanilina, para todas as componentes de cor e sua média.

Componente	RMSD ($\times 10^{-3}$ M)
R	7,41
G	1,13
B	15,6
Média	1,16

Verifica-se, através das Tabelas 7 e 8, que a componente verde foi a que garantiu maior exatidão para o método, com $\text{RMSD} = 1,13 \times 10^{-3}$ M. Entretanto, se houvesse a necessidade de se escolher qual das componentes para trabalhar em condições de maiores linearidade e exatidão simultaneamente, seria escolhida a média entre as componentes RGB.

4.3.3 Verificação da seletividade do método frente a outras classes de aminas

As Figuras 28 e 29 apresentam as curvas analíticas do sinal RGB (e sua média) em função da concentração de N,N-dimetilanilina, em presença de butilamina e morfolina, respectivamente.

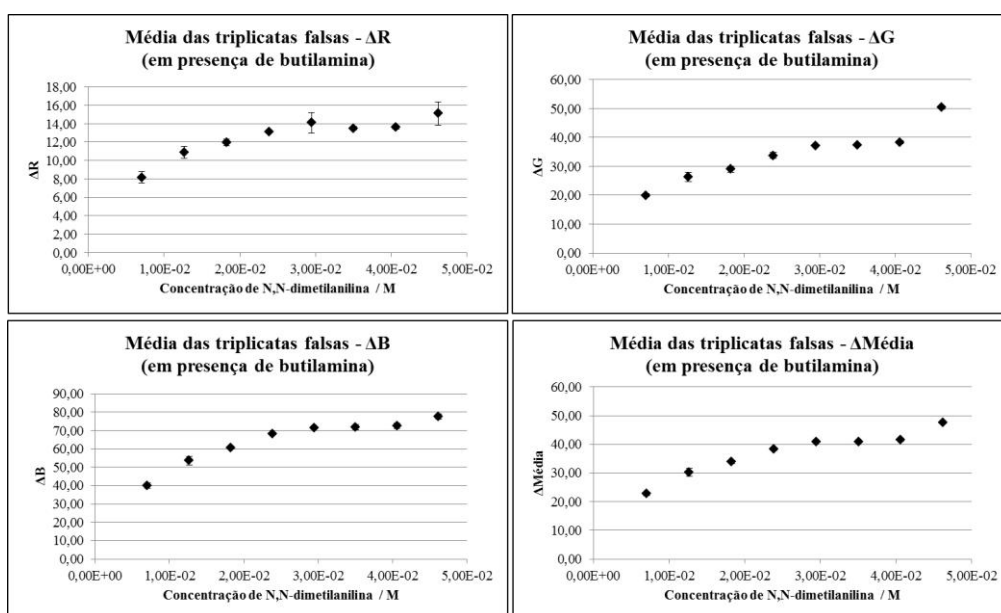


Figura 28 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas falsas, em função da concentração de N,N-dimetilanilina (M), em presença de butilamina, para a elaboração de suas respectivas curvas analíticas.

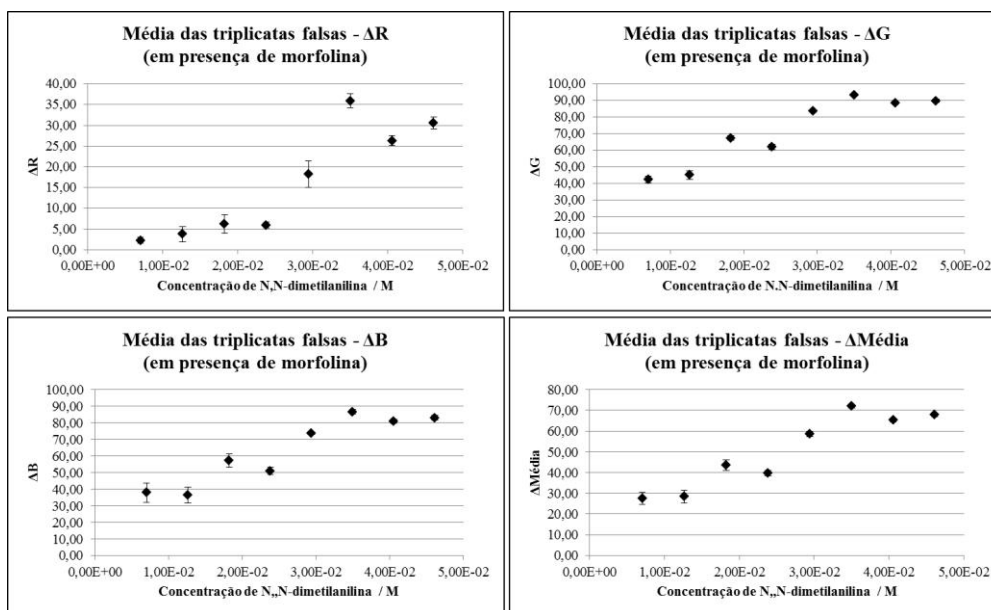


Figura 29 – Gráficos dos valores médios de cada componente, considerando suas triplicatas falsas, em função da concentração de N,N-dimetilanilina (M), em presença de butilamina, para a elaboração de suas respectivas curvas analíticas.

A fim de se comparar os resultados do método desenvolvido para N,N-dimetilanilina na ausência de outras aminas, para avaliar a sua linearidade, sensibilidade e exatidão, escolheu-se a componente Média para a avaliação da influência de butilamina e morfolina, sobre as respostas, pois esta componente apresentou os melhores resultados para linearidade e exatidão do método para N,N-dimetilanilina, simultaneamente.

As equações das retas obtidas a partir da regressão linear dos dados de cada ensaio, para a componente Média, estão apresentadas no Quadro 15. Os coeficientes de correlação (r) também estão expressos no quadro.

Quadro 15 - Equações das retas e coeficientes de correlação obtidos a partir da regressão linear dos dados, pelo método dos mínimos quadrados, da componente Média em função da concentração de N,N-dimetilanilina, em presença (ou não) de outras aminas.

Amina (s)	Equação da reta (componente Média)	Coefficiente de correlação (r)
N,N-dimetilanilina	$y = 1621x + 1,3704$	0,9922
N,N-dimetilanilina + butilamina	$y = 542,24x + 22,562$	0,9522
N,N-dimetilanilina + morfolina	$y = 1215,2x + 1,3704$	0,9330

A presença de aminas primária e secundária, pelos resultados indicados no Quadro 15, afetam a linearidade e a sensibilidade do método: o coeficiente de correlação diminui com a presença destas aminas, e o coeficiente angular também, o que faz com que pequenas variações na concentração de N,N-dimetilanilina não revelem significativas diferenças no sinal medido, se comparadas ao método somente com a amina terciária.

Os limites de detecção e quantificação também foram estimados, considerando a curva analítica para a componente Média. O Quadro 16 apresenta os resultados para a amina terciária, e para esta em presença de outras aminas.

Quadro 16 – Limites de detecção e quantificação, obtidos a partir da curva analítica para a componente Média, de N,N-dimetilanilina, em presença (ou não) de outras aminas.

Amina (s)	Componente: Média	
	LD (M)	LQ (M)
N,N-dimetilanilina	*	$7,04 \times 10^{-3}$
N,N-dimetilanilina + butilamina	*	$7,04 \times 10^{-3}$
N,N-dimetilanilina + morfolina	*	$7,03 \times 10^{-3}$

*Não expressos

De acordo com o Quadro 16, não houve mudanças significativas sobre o limite de quantificação de N,N-dimetilanilina quando esta se encontra em meio contendo butilamina ou morfolina.

Para avaliar a influência da presença de outras aminas sobre a exatidão do método, foram calculadas as recuperações (tendências) de N,N-dimetilanilina, com o auxílio da Equação 7. Os resultados, considerando a componente Média, estão expressos na Tabela 9.

Tabela 9 – Recuperação analítica de amostras de N,N-dimetilanilina, na presença (ou não) de outras aminas, a partir da curva analítica da componente Média, e valores de RMSD para a predição.

Amina (s)	Recuperação (%) – componente: Média	RMSD (×10 ⁻³ M)
<i>N,N-dimetilanilina</i>		
Amostra 1	88,14	1,16
Amostra 2	99,38	
Amostra 3	100,24	
<i>N, N-dimetilanilina + butilamina</i>		
Amostra 1	139,24	5,68
Amostra 2	113,19	
Amostra 3	83,99	
<i>N,N-dimetilanilina + morfolina</i>		
Amostra 1	125,78	17,6
Amostra 2	57,78	
Amostra 3	63,81	

Verifica-se, através dos resultados presentes na Tabela 9, que a presença de outras aminas diminui a exatidão do método. A morfolina interfere mais sobre a exatidão do que a butilamina.

Portanto, embora o método seja seletivo para aminas terciárias, os seus parâmetros analíticos são afetados pela presença de outras classes de aminas, como butilamina e morfolina, influenciando na sua robustez.

4.3.4 Comparação da exatidão entre análise de imagens e espectrometria na região do ultravioleta-visível

A Figura 30 apresenta o espectro de absorção, na região do ultravioleta-visível, do produto formado pela reação entre N,N-dimetilanilina e o reagente de Palumbo. O produto possui absorção máxima em 390 nm. A Figura 31 apresenta a curva analítica da absorvância em 390 nm em função da concentração de N,N-dimetilanilina.

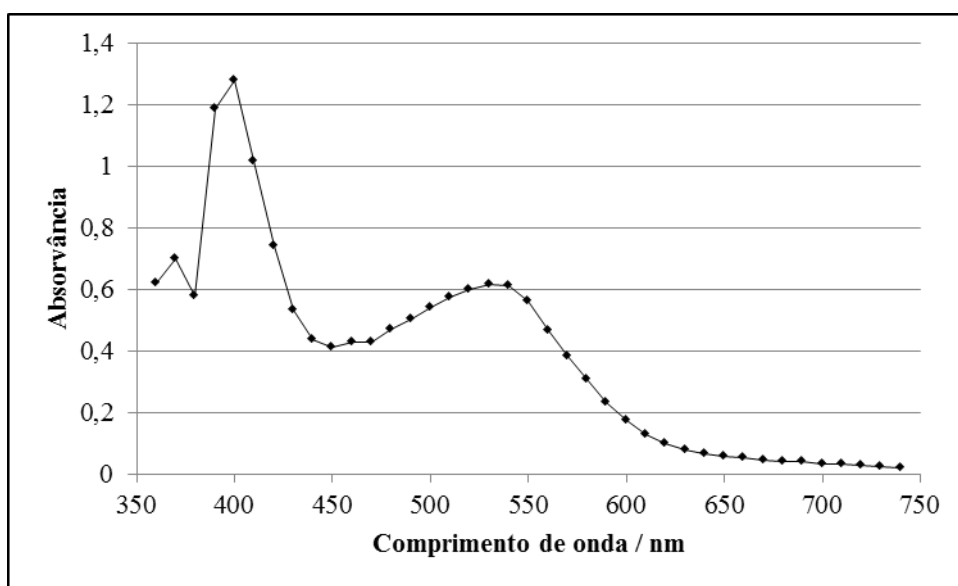


Figura 30 – Espectro de absorção (ultravioleta-visível) do produto formado pela reação entre N,N-dimetilanilina e o reagente de Palumbo.

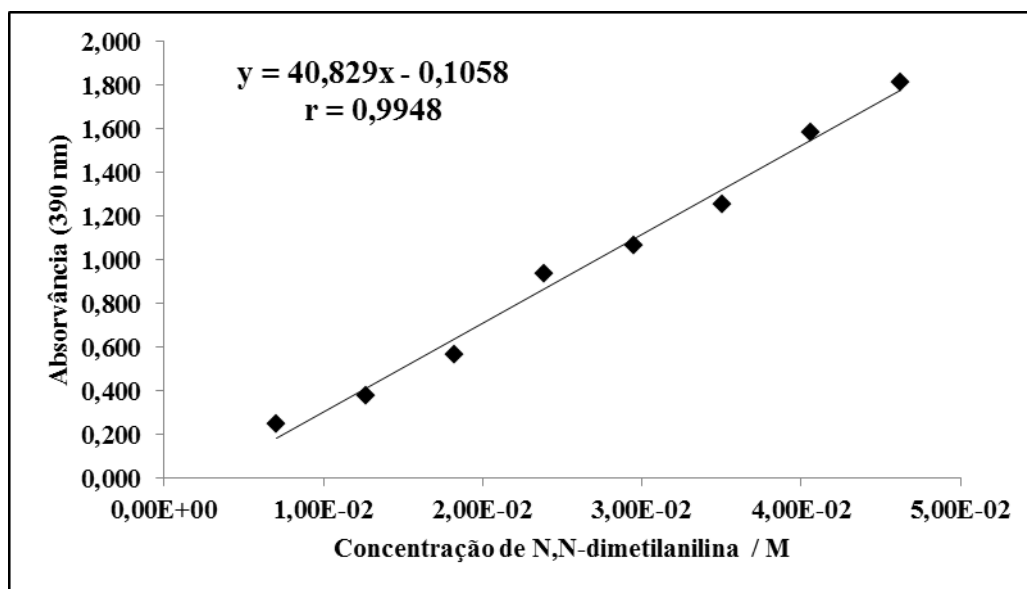


Figura 31 – Curva analítica (absorvância em 390 nm contra a concentração de N,N-dimetilanilina), equação da reta obtida pela regressão linear e o coeficiente de correlação (r).

Para comparar a exatidão entre a análise de imagens e a técnica espectrométrica citada, a Tabela 10 mostra as recuperações (%) de N,N-dimetilanilina, calculadas com o auxílio da Equação 7, obtidas pelas duas técnicas analíticas. Para a análise de imagens, foi considerada a componente Média. Os resultados para o desvio quadrático médio também estão na tabela.

Tabela 10 – Recuperação analítica de amostras de N,N-dimetilanilina a partir de duas técnicas analíticas diferentes.

Amostra de N,N-dimetilanilina	Recuperação (%)	
	Análise de imagens (componente: Média)	Espectrometria UV-vis
1	88,14	109,46
2	99,38	100,09
3	100,24	105,63
RMSD ($\times 10^{-3}$ M)	1,16	2,54

De acordo com os dados da Tabela 10, o método por análise de imagens apresentou maior exatidão do que por espectrometria na região do ultravioleta-visível. Este resultado se torna interessante, do ponto de vista de que a análise de imagens apresenta menor custo: o seu sensor é uma *webcam*, que é relativamente mais barato do que um espectrômetro. Ademais, o seu aparato experimental é mais prático e menos volumoso.

4.4 Caracterização dos produtos e do reagente de Palumbo por espectrometria na região do ultravioleta-visível

Os espectros de absorção, na região do ultravioleta-visível, das amostras A-E estão apresentados na Figura 32.

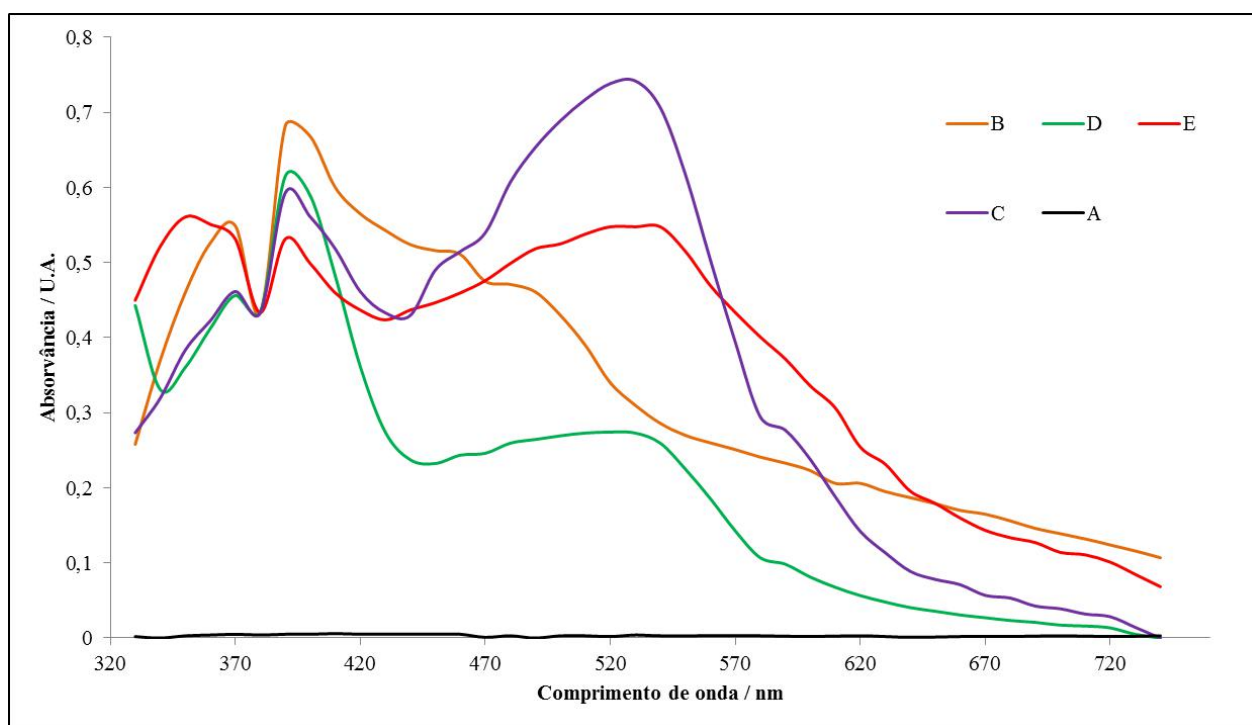


Figura 32 – Espectros de absorção (UV-vis) dos produtos formados entre as aminas terciárias e o reagente de Palumbo, do reagente de Palumbo e deste após 110 dias de preparo.

Onde:

A – Reagente de Palumbo recém preparado (solução de ácido cítrico 2% em anidrido acético);

B – Reagente de Palumbo após 110 dias de preparo;

C – Produto formado da reação entre trietilamina e o reagente de Palumbo recém-preparado;

D – Produto formado da reação entre N,N-dimetilanilina e o reagente de Palumbo recém-preparado;

E – Produto formado da reação entre piridina e o reagente de Palumbo recém-preparado;

Não há absorção de radiação UV-visível para o reagente de Palumbo assim que ele é preparado, o que mostra a ausência de cor que esta solução possui, confirmando que o branco utilizado nas análises deste trabalho não apresentava cor.

Como dito anteriormente, o reagente de Palumbo adquire coloração ao longo do tempo de estoque (NEELY, 1993), e isto é confirmado de forma espectrométrica, ao ser analisado o espectro da amostra B, no qual há absorção entre 400 – 420 nm. A solução apresentava cor castanho escuro.

Quanto às amostras C – E, estas não ajudam diretamente na elucidação das estruturas dos produtos formados, porém mostram que a cor obtida está entre o vermelho e o violeta, pois as três apresentam absorção entre 520-540 nm, que corresponde ao verde (cor complementar do vermelho). Sabe-se que piridina, trietilamina e N,N-dimetilanilina apresentam máximos de absorção em 256, 212 e 254 nm, respectivamente (ROBERTSON; MATSEN, 1950). Sendo assim, não se pode relacionar o máximo observado em 390 nm à estrutura de alguma dessas aminas.

Este estudo não se mostra, ainda, suficiente para contribuir com a elucidação dos passos da reação entre aminas terciárias e o reagente de Palumbo, mas ficam registradas as cores dos produtos formados, por meio de seus respectivos espectros de absorção na região do UV-visível.

5 CONCLUSÕES

Foi desenvolvido um método quantitativo por análise de imagens em tempo real para a quantificação de aminas terciárias – trietilamina, piridina e N,N-dimetilanilina. Vale lembrar que o mesmo método necessita de uma otimização prévia, pois como foi visto, o tempo de aquecimento em banho-maria varia para cada uma das aminas, além da faixa de concentração para a construção de uma curva analítica. O equipamento protótipo desenvolvido neste trabalho apresentou bom desempenho.

Para o método com trietilamina, verificou-se que este apresenta repetitividade, mas não é reprodutível. Entretanto, o uso da análise de imagens garantiu linearidade ao método ($r > 0,98$), independente da componente de cor utilizada. Obteve-se maior sensibilidade nas medições ao ser utilizada a componente azul (B). Além disso, foram estimados os limites de detecção e quantificação do método, apresentando os menores valores para o uso da componente B: $1,67 \times 10^{-3}$ e $3,24 \times 10^{-3}$ M, respectivamente. A componente vermelha (R) apresentou a melhor exatidão para o método.

Para a piridina, o método desenvolvido é repetitivo (para o uso das componentes G, B e média), mas não fornece reprodutibilidade. A sua linearidade foi estimada, e somente a componente vermelha (R) apresentou os melhores resultados ($r = 0,9689$). Foi verificado que a deficiência em linearidade para o uso das outras componentes é função da limitação da reação, pois houve saturação da cor do produto formado, não sendo, portanto, função do instrumento utilizado. A sensibilidade, para o uso de qualquer componente, é equiparável. Foi possível estimar somente o limite de quantificação do método, para o uso de todas as componentes de cor, e este foi igual a $8,80 \times 10^{-4}$ M. A componente R forneceu resultados com maior exatidão para a determinação da concentração de amostras de piridina, a partir da curva analítica elaborada.

Quanto ao método desenvolvido para a determinação de N,N-dimetilanilina, este também é repetitivo, mas não reprodutível. Sua linearidade foi estimada, e o uso de qualquer componente de cor, para a construção da curva analítica, apresentou um coeficiente de correlação maior que 0,95, sendo a maior linearidade verificada para o uso da média entre as componentes RGB ($r = 0,9922$). O uso da componente verde (G) como variável dependente da concentração da amina apresentou maior sensibilidade para o método, e também forneceu

os menores limites de detecção e quantificação, ambos estimados. A exatidão do método é melhor quando também há uso da componente G.

Ainda sobre o método para N,N-dimetilanilina, as análises desta amina em presença de outras, como butilamina e morfolina, indicaram uma diminuição na exatidão, na linearidade e na sensibilidade do método. Não houve mudanças significativas na estimativa do limite de quantificação. Diante disso, percebe-se que a robustez do método é afetada quando há presença de outras classes de aminas.

Foi comparada a exatidão do método para N,N-dimetilanilina quando há uso de duas técnicas diferentes: análise de imagens e espectrometria na região do UV-visível. A análise de imagens, a partir das medições da média entre as componentes RGB para cada concentração de amina, apresentou exatidão maior do que a técnica espectrométrica sobre a determinação de amostras contendo N,N-dimetilanilina.

De forma geral, para toda e qualquer determinação de amina terciária pelo método proposto, percebe-se que esta deve ser precedida da construção da curva analítica, haja visto que o método não apresenta reprodutibilidade. A técnica de análise de imagens em tempo real, além de fornecer um enorme número de dados, com amostragens sendo realizadas em intervalos de 1 segundo, possibilita a livre escolha de qual componente de cor será utilizada para o fim a que se destina: em qual se encontra maior linearidade, qual componente fornece resultados mais exatos etc.

A técnica de análise de imagens em tempo real apresenta notáveis vantagens: o sensor utilizado, a *webcam*, é mais acessível que um espectrômetro; uma curva analítica, com oito pontos, pode ser elaborada em até 10 minutos, aproximadamente; os ensaios exigem menos etapas e reagentes do que nas técnicas utilizadas nos métodos convencionais (RATHORE; AKHTAR; SHARMA, 1984; SIGGIA, 1963). Com essas qualidades apresentadas, espera-se que esta técnica possa ser utilizada em disciplinas de análise orgânica ou afins, com a finalidade de abordar tanto os ensaios de Feigl, como avanços em tecnologia química. Ademais, ainda como perspectivas futuras, são visadas melhorias no método para a sua aplicação em amostras reais, em estudos de poluição ambiental, na determinação de alguns alcaloides, de nitrogênio de aminas terciárias em medicamentos, e outros fins. Espera-se, também, que a técnica de análise de imagens seja aplicada na determinação de outros compostos orgânicos, a partir de diferentes ensaios de Feigl.

Foram caracterizados, por espectrometria na região do UV-visível, os produtos obtidos a partir da reação entre as aminas terciárias, utilizadas neste trabalho, com o reagente de Palumbo. Também foram obtidos os espectros de absorção para o reagente de Palumbo, quando este está recém-preparado, e com mais de 110 dias de preparo. Os espectros fornecem informações sobre a cor dos produtos e a mudança que ocorre no reagente de Palumbo conforme o tempo de estoque, mas ainda não se mostram suficientes para elucidar os passos da reação.

REFERÊNCIAS

- AUTERHOFF, H.; SCHWINGEL, I. Über die Reaktion von Zitronensäure mit Acetanhydrid und Pyridin. **Archive der Pharmazie**, v. 308, n. August, p. 583–587, 1975.
- BATLEY, G. E.; FLORENCE, T. M.; KENNEDY, J. R. Fluorimetric method for the determination of long-chain amines in water. **Talanta**, v. 20, n. 2, p. 987–992, 1973.
- BRITO, N. M. et al. Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003.
- CÁMARA-CHÁVEZ, G. **Sistema de Cores**. Disponível em: <[http://www.decom.ufop.br/guillermo/BCC326/slides/Processamento de Imagens - Sistema de Cores.pdf](http://www.decom.ufop.br/guillermo/BCC326/slides/Processamento%20de%20Imagens%20-%20Sistema%20de%20Cores.pdf)>. Acesso em: 27 jun. 2017.
- COSTA NETO, C. **Análise orgânica: métodos e procedimentos para caracterização de organoquímicos**. v. 1, 1 ed. Rio de Janeiro: Editora da UFRJ, 2004.
- ESPINOLA, A. **Fritz Feigl: Atualidade de seu Legado Científico**. 1. ed. Rio de Janeiro: Instituto de Química / COPPE - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.
- ESPINOLA, A.; PINTO, M. A. DA S.; COSTA NETO, C. Fritz Feigl (1891-1971) - The Centennial of a Researcher. **Bulletin for the History of Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 31–39, 1995.
- FEIGL, F. **Spot Tests in Organic Analysis**. 7. ed. [s.l.] Elsevier Science, 1966.
- GONZAGA, A.; RODRIGUES, E. L.; VIEIRA, M. A. DA C. **Processamento de Imagens Coloridas**. Disponível em: <http://iris.sel.eesc.usp.br/sel886/Aula_3.pdf>. Acesso em: 27 jun. 2017.
- HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 8. ed. [s.l.] LTC, 2012.
- HELENE, O. **Método dos Mínimos Quadrados - com ênfase em variâncias e com recursos matriciais**. Disponível em: <<http://livrommq.blogspot.com.br/>>. Acesso em: 27 jul. 2017.
- ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE), __. **Validation of analytical procedures: methodology**. Geneva:

ICH/IFPMA, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos**, 2010.

KENNETH, A. Chromogenic reactions of tertiary amines with polycarboxylic acids and acetic anhydride: carbon suboxide as the reactive species in the malonic acid reagent. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 834–838, 1987.

LANGLEY, W. D. Reaction of tertiary amine-, quaternary ammonium-, and inorganic salts with citric acid in acetic anhydride. **Analytical chemistry**, v. 39, n. 2, p. 199–202, 1967.

NAKAYAMA, H. T. **Análise funcional orgânica de xistos oleígenos brasileiros**. [s.l.] Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1980.

NEELY, F. L. Flow-injection determination of tylosin in fermentation broth. **Analytica Chimica Acta**, v. 281, n. 2, p. 243–247, 1993.

PALUMBO, M. Applicazione della reazione cromatica fra Anidride Cis-Aconitica e Amine Terziarie al riconoscimento di sostanze di interesse farmaceutico. **Farmaco, Scienza E Tecnica**, v. 3, p. 675–677, 1948.

PATTERSON, S. **RGB and Color Channels in Photoshop Explained**. Disponível em: <<http://www.photoshopessentials.com/essentials/rgb/>>. Acesso em: 27 jun. 2017.

RATHORE, H. S. Chromatographic and related spot tests for the detection of water pollutants. **Journal of Chromatography A**, v. 733, n. 1–2, p. 5–17, 1996.

RATHORE, H. S.; AKHTAR, M. N.; SHARMA, S. K. A new spot test for the detection of traces of citric and tartaric acids in vinegar. **Microchemical Journal**, v. 177, p. 172–177, 1984.

RATHORE, H. S.; QURESHI, M.; SULAIMAN, A. M. A new sensitive and simple spot test for the detection of tertiary amine pollutants in water. **Water Research**, v. 16, p. 435–440, 1982.

RIBANI, M. et al. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIBEIRO, F. A. DE L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras

de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

ROBERTSON, W. W.; MATSEN, F. A. The Near Ultraviolet Absorption Spectra of N-Substituted Anilines. **Journal of American Chemical Society**, v. 72, p. 1543–1544, 1950.

SASS, S. et al. Colorimetric estimation of tertiary and quaternary amines. **Analytical chemistry**, v. 30, n. 4, p. 529–531, 1958.

SIGGIA, S. **Quantitative Organic Analysis - via Functional Groups**. 3. ed. New York and London: John Wiley and Sons, Inc., 1963.

SILVA, J. F. C.; SILVA, A. P. M.; SENA, R. C. Real-time analysis to evaluate crystallization processes. In: **Crystallization - Science and Technology**. [s.l.] InTech, 2012. p. 305.

SILVA, A. D. P. M. DA et al. Low-cost system based on image analysis to determine solubility curves. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 177, p. 1071–1074, 2013.

SISODIYA, E. S. **Difference Between CCD And CMOS**. Disponível em: <<http://www.udaipurtalents.com/technical-learning/difference-between-ccd-and-cmos>>. Acesso em: 13 jun. 2017.

SOUZA, J. S. DE; CARDOZA, J. A. S. Sensores de Imagem Digitais CCD E CMOS. p. 1–8, 2012.

THOMAS, A. D. Spectrophotofluorometric determination of some alkaloids containing a tertiary amine group. **Talanta**, v. 22, n. C, p. 865–869, 1975.

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE. **O sistema RGB e o cubo de cores**. Disponível em: <http://www.uff.br/cdme/matrix/matrix-html/matrix_color_cube/matrix_color_cube_br.html>. Acesso em: 16 mar. 2017.

VESSMAN, J. et al. IUPAC Recommendations 2001. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v. 73, p. 1381–1386, 2001.